

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELE CRISTINA DE LIMA

USO DE PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO DE CÃES

CURITIBA

2019

DANIELE CRISTINA DE LIMA

## USO DE PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO DE CÃES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Área de concentração de Nutrição animal de não ruminantes, Setor Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Zootecnia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ananda Portella Félix

CURITIBA

2019

L732u

Lima, Daniele Cristina de  
Uso de prebióticos e probióticos na nutrição de cães / Daniele  
Cristina de Lima. - Curitiba, 2019.  
77 p.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
Orientadora: Ananda Portella Félix

1. Bacillus subtilis. 2. Levedos. 3. Microbiota. 4. Cão - Nutrição.  
I. Félix, Ananda Portella. II. Título. III. Universidade Federal do  
Paraná.

CDU 636.7.084



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA -  
40001016082P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOTECNIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **DANIELE CRISTINA DE LIMA** intitulada: **Uso de prebióticos e probióticos na nutrição de cães**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2019.

ANANDA PORTELLA FÉLIX

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ANA VITORIA FISCHER DA SILVA

Avaliador Externo (UFPR)

RICARDO SOUZA VASCONCELOS

Avaliador Externo (UEM)

ALEX MALCORRA

Coordenador - Avaliador Interno (UFPR)

*Dedico:*

*A minha mãe Maria Eloisa*

*Ao meu irmão Matheus*

*Ao meu companheiro de vida Elton*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe Eloisa, ao meu irmão Matheus e aos meus familiares que me dão força e carinho para seguir em frente.

Ao meu companheiro, amigo, Elton por me ajudar sempre que eu preciso, pela paciência e companheirismo.

Aos professores Dr. Alex Maiorka e Dra. Simone Gisele de Oliveira que me ensinam e continuam sempre me ensinando muito.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ananda Portella Félix, professora, orientadora, amiga, conselheira, pela amizade, confiança e por tudo que me ensinou até aqui.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Chayane da Rocha, pela amizade e pelos ensinamentos.

Às minhas grandes amigas Marina e Alessandra, minhas irmãs que me deram força em todos os momentos desde o início da graduação e por estarem sempre prontas a me apoiar, escutar e ajudar.

À todas as pós-graduandas do LENCUCAN que convivi durante essa jornada, em especial Cleusa, Camilla, Gislaine, Alina e Taís por toda a ajuda, e por demonstrarem um coração enorme e grande amizade.

À todas as estagiárias do LENCUCAN que me ajudaram muito durante todo esse processo, com experimentos e análises, com muita dedicação e esforço.

À todos os pós graduandos e estagiários do LEPNAN, em especial, Lucas, Josiane, Leopoldo, Thiago Cancelli, Vivian, Marley, pela parceria nas festinhas, pelas risadas e pela ajuda nos momentos não tão bons.

Ao pessoal do LNA, Cleusa, Aldo, Rui, Hair e Marcelo pela ajuda e paciência nos dias em que passei no laboratório.

Aos cães do LENCUCAN (1º, 2º e 3º geração) e aos meus cães Zeus e Cléo, e a minha gata Rihanna, pelo amor incondicional e por me ensinarem que é preciso pouco para ser feliz.

À Deus por iluminar sempre meus caminhos.

**E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui!**

Daniele Cristina de Lima

## RESUMO

Prebióticos e probióticos tem sido largamente utilizados na indústria de pet food, principalmente com a função de melhorar a saúde intestinal e aumentar a longevidade de cães. Prebiótico é um ingrediente alimentar não digestível pelas enzimas do intestino delgado que beneficia o organismo por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias no cólon, promovendo a saúde do hospedeiro. Já os probióticos, são produtos constituídos por microrganismos vivos que, uma vez introduzidos no organismo animal influenciam benéficamente o hospedeiro por meio da melhoria do balanço microbiano intestinal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inclusão de levedura autolisada ou *Bacillus subtilis* em dietas de cães. No experimento I foram utilizadas as seguintes dietas: controle, sem adição de levedura (CO); Dieta CO + 1% de levedura autolisada adicionada na massa (1%M) e Dieta CO + 1% de levedura autolisada adicionada por cobertura (1%C). Para digestibilidade e produtos de fermentação intestinal, foram utilizados 15 cães adultos da raça Beagle, distribuídos inteiramente ao acaso, com 5 repetições por tratamento. Os cães foram alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais (n=5), sendo 25 dias de adaptação e 5 dias de coleta total de fezes. No teste de preferência alimentar foram utilizados 16 cães e realizados as seguintes comparações: CO vs 1%M; CO vs 1%C e 1%M vs 1%C. Cada teste foi realizado por um período de 2 dias, totalizando 32 repetições. Houve maior número de primeiras escolhas para a dieta 1%C, em relação às demais dietas ( $P < 0,05$ ). Para a razão de ingestão, nos testes entre os tratamentos CO vs 1%M e CO vs 1%C os cães consumiram maior quantidade da dieta CO e 1%C ( $P < 0,01$ ), respectivamente. No experimento II, dezesseis cães Beagle adultos foram distribuídos aleatoriamente ( $n = 8$ ) para um dos dois tratamentos dietéticos por 33 dias: controle (sem probiótico) e probiótico (*B. subtilis* C-3102,  $1 \times 10^6$  UFC / g de dieta). Não houve diferença entre os coeficientes de digestibilidade aparente do trato total (CTTAD) e a energia metabolizável (EM) das dietas ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não houve diferenças para o pH fecal e ácido siálico ( $P > 0,05$ ). No entanto, maior escore fecal ( $P < 0,001$ ), conteúdo de matéria seca ( $P = 0,021$ ) e concentração de ácido propiônico ( $P = 0,039$ ) e menor odor fecal ( $P < 0,001$ ) e amônia ( $P = 0,037$ ) foram observados em cães alimentados com probiótico. O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que a adição de *B. subtilis* alterou a microbiota intestinal de cães. Alterações proporcionais da microbiota intestinal entre os grupos foram detectadas em quatro filos principais e 13 gêneros de bactérias ( $P < 0,05$ ). A diversidade bacteriana do intestino foi maior ( $P = 0,021$ ) em cães alimentados com probiótico. Dessas mudanças, o interesse particular foi a maior abundância de *Faecalibacterium* em cães alimentados com probiótico, que é considerado como tendo efeitos benéficos sobre a saúde intestinal. A inclusão de 1% de levedura autolisada em cobertura aumenta a palatabilidade de alimentos destinados a cães em relação à dieta controle. Já a inclusão de 33 g/tonelada de *B. subtilis* na dieta aumenta a consistência e o ácido propiônico fecal e reduz a amônia e o odor das fezes dos cães. Ainda, altera a microbiota intestinal, mas não afeta a digestibilidade dos nutrientes e energia da dieta.

Palavras chave: *Bacillus subtilis*, Levedura autolisada, Microbiota, Saúde intestinal.

## ABSTRACT

Prebiotics and probiotics have been widely used in the pet food industry, mainly with the function of improving intestinal health and increasing the longevity of dogs. Prebiotic is a food ingredient not digestible by small intestine enzymes that benefits the body by selectively stimulating the growth and/ or activity of certain bacteria in the colon, promoting the health of the host. Probiotics are products composed of living microorganisms that, once introduced into the animal organism, beneficially influence the host by improving the intestinal microbial balance. Thus, the objective of this work was to evaluate the inclusion of autolysed yeast or *Bacillus subtilis* in dog diets. In the experiment I the following diets were used: control, without addition of yeast (CO); Diet CO + 1% of autolysed yeast added in the mass (1% M) and Diet CO + 1% of autolysed yeast added by coverage (1% C). For digestibility and intestinal fermentation products, 15 adult beagle dogs were used, randomly distributed with 5 replicates per treatment. Dogs were fed for 30 days with experimental diets (n = 5), 25 days of adaptation and 5 days of total collection of feces. In the food preference test, 16 dogs were used and the following comparisons were made: CO vs 1% M; CO vs 1% C and 1% M vs 1% C. Each test was performed for a period of 2 days, totaling 32 replicates. There were more first choices for the 1% C diet, in relation to the other diets ( $P < 0.05$ ). For the intake ratio, in the tests between CO treatments vs 1% M and CO vs 1% C the dogs consumed higher amounts of the diet CO and 1% C ( $P < 0.01$ ), respectively. In the experiment II, sixteen adult Beagle dogs were randomly assigned (n=8) to one of the two dietary treatments for 33 days: control (no probiotic) and probiotic (*B. subtilis* C-3102,  $1 \times 10^6$  CFU/g diet). There was no difference between the coefficients of total tract apparent digestibility (CTTAD) and metabolisable energy (ME) of diets ( $P > 0.05$ ). Likewise, there were no differences for faecal pH and sialic acid ( $P > 0.05$ ). However, greater faecal score ( $P < 0.001$ ), dry matter content ( $P = 0.021$ ) and propionic acid concentration ( $P = 0.039$ ) and lower faecal odor ( $P < 0.001$ ) and ammonia ( $P = 0.037$ ) were observed in dogs fed with probiotic. The 16S rRNA gene sequencing revealed that the addition of *B. subtilis* altered gut microbiota of dogs. Proportional changes of gut microbiota between groups were detected in four major phyla and 13 genera of bacteria ( $P < 0.05$ ). Gut bacterial diversity was greater ( $P = 0.021$ ) in dogs fed probiotic. Of these changes, particular interest was the greater abundance of *Faecalibacterium* in dogs fed probiotic, which is considered to have beneficial effects on gut health. The inclusion of 1% of autolysed yeast in cover increases the palatability of foods destined to dogs in relation to the control diet. Already the inclusion of 33 g/ tonne *B. subtilis* in the diet increases the consistency and the fecal propionic acid and reduces the ammonia and the odor of the feces of the dogs. Still, it alters the intestinal microbiota, but does not affect the digestibility of nutrients and dietary energy.

Key words: *Bacillus subtilis*, Auto immune yeast, Microbiota, Intestinal health.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1 - DISTRIBUTION OF FAECAL SCORES DURING THE STUDY (1 = WATERY FAECES TO 5 = WELL-SHAPED, HARD AND DRY FAECES). .....	56
FIGURE 2 - INDIVIDUAL DISTRIBUTION OF THE MAIN PHYLUM FOUND IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC. ....	57
FIGURE 3 - MEAN AND STANDARD DEVIATION OF THE ABUNDANCE OF THE BACTERIAL GENERA STATISTICALLY DIFFERENT ( $P < 0.05$ ) IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.....	58
FIGURE 4 - PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC. ....	59
FIGURE 5 - RICHNESS OF BACTERIAL COMMUNITIES (NUMBER OF OTUS PER 12804 READINGS) OF FECES OF DOGS FED CONTROL OR PROBIOTIC DIETS ( $P = 0.021$ ). .....	59

## LISTA DE TABELAS

### **CAPITULO II – UTILIZAÇÃO DE LEVEDURA AUTOLISADA SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL E PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE CÃES**

Tabela 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA AUTOLISADA E DAS DIETAS EXPERIMENTAIS COM BASE NA MATÉRIA SECA.....	34
Tabela 2 - MÉDIA DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA, %), ENERGIA METABOLIZÁVEL (EM, KCAL/KG) E CARACTERÍSTICAS FECALIS DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETA CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBER.....	39
Tabela 3 - MEDIANAS DE ESCORE FECAL E ODOR FECAL DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBERTURA (1%C).....	39
Tabela 4 - PRIMEIRA ESCOLHA DA DIETA A (N) E RAZÃO DE INGESTÃO (RI + ERRO PADRÃO) DAS DIETAS CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBERTURA (1%C).....	40

### **CAPITULO III – EFEITOS DE BACILLUS SUBTILIS C-3102 SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA, CARACTERÍSTICAS FECALIS E MICROBIOTA DE CÃES**

Table 1 - CHEMICAL COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS BASED ON DRY MATTER. ....	50
Table 2 - MEANS OF COEFFICIENTS OF TOTAL TRACT APPARENT DIGESTIBILITY (CTTAD, %), METABOLIZABLE ENERGY (ME, KCAL/KG) AND INTESTINAL FERMENTATIVE END-PRODUCTS OF DOGS FED WITH CONTROL AND PROBIOTIC DIET.....	54
Table 3 - MEDIAN FECAL SCORE, AMMONIA, AND FAECAL ODOR OF DOGS FED CONTROL AND PROBIOTIC DIETS.....	55

Table 4 - MEAN AND STANDARD DEVIATION (SD) OF THE MAIN PHYLUM FOUND IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.....	56
Table 5 - MEAN AND STANDARD DEVIATION (SD) OF THE ABUNDANCE OF THE BACTERIAL GENERA STATISTICALLY DIFFERENT IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC. ....	57

## **LISTA DE ABREVEATURAS**

CDA	Coeficiente de Digestibilidade Aparente
UM	Umidade
EE	Extrato etéreo
EM	Energia Metabolizável
PB	Proteína bruta
MM	Matéria mineral
FB	Fibra bruta
RI	Ração da Ingestão
MOS	Mananoligossacarídeos
FOS	Frutoligossacarídeos
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR	Ácidos graxos de cadeia ramificada

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	11
1 - INTRODUÇÃO .....	11
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES .....	12
2.1.1 Produtos da fermentação intestinal .....	13
2.2 PREBIÓTICOS.....	15
2.3 PROBIÓTICOS .....	19
2.3.1 Probióticos na nutrição de cães .....	20
3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPITULO II – UTILIZAÇÃO DE LEVEDURA AUTOLISADA SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA, PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO INTESTINAL E PREFERÊNCIA ALIMENTAR DE CÃES.....	31
RESUMO .....	31
ABSTRACT .....	32
1 - INTRODUÇÃO .....	33
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS .....	34
2.2 EXPERIMENTO I: DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECAIS .....	35
2.2.1 Animais e instalações.....	35
2.2.2 Procedimentos Experimentais.....	35
2.2.3 Desenho experimental e análise estatística .....	37
2.3 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE .....	37
2.3.1 Animais e instalações.....	37
2.3.2 Procedimentos experimentais .....	38
2.3.3 Desenho experimental e análise estatística .....	38
3 - RESULTADOS.....	39
3.1 EXPERIMENTO I: ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECAIS .....	39

3.2 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE .....	40
4 - DISCUSSÃO .....	40
4.1 EXPERIMENTO I: ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECAIS .....	40
4.2 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE .....	42
5 - CONCLUSÃO .....	43
REFERÊNCIAS .....	44
CAPITULO III – EFEITOS DE BACILLUS SUBTILIS C-3102 SOBRE A DIGESTIBILIDADE DA DIETA, CARACTERÍSTICAS FECAIS E MICROBIOTA DE CÃES	
47	
RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	48
1- INTRODUCTION.....	49
2- MATERIALS AND METHODS .....	49
2.1 ANIMALS AND FACILITIES.....	49
2.2 EXPERIMENTAL DIETS .....	50
2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES .....	50
2.4 EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS .....	53
3 - RESULTS .....	54
4 - DISCUSSION.....	59
5 - CONCLUSIONS.....	63
REFERENCES.....	64
CAPITULO IV - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS .....	77
APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA.....	77

## **CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1 - INTRODUÇÃO**

As dietas comerciais destinadas a cães e gatos estão cada vez mais específicas quanto às raças, animais castrados, obesos, com alguma patologia ou até mesmo para animais de companhia que vivem dentro de casa. No geral, o que pode diferenciar estas dietas é a inclusão de diferentes aditivos, por isso, a inclusão destes ingredientes tem sido cada vez mais importante na indústria de pet food.

De acordo com a instrução normativa 44/2015, aditivos são substâncias, microrganismos ou produtos formulados e adicionados intencionalmente aos alimentos, que não são utilizados normalmente como ingredientes, tenham ou não valor nutritivo e que melhorem as características dos produtos destinados à alimentação animal, melhorando o desempenho dos animais sadios e atendendo às necessidades nutricionais.

Em alimentos completos destinados a cães, os aditivos são largamente utilizados e apresentam diversas funções, como para a conservação das dietas e melhoria do aspecto em relação a textura, cor e sabor. Ainda, os aditivos podem melhorar a saúde, bem-estar e longevidade dos animais de companhia. Estes últimos se enquadram ao grupo de aditivos zootécnicos, os quais englobam substâncias conhecidas como “alimentos funcionais” e são os mais estudados.

No Brasil, no mínimo 60,9% das dietas secas extrusadas para cães utilizam aditivos para melhorar a saúde intestinal e/ou características fecais dos animais (FÉLIX et al., 2013). Entre eles, destacam-se os pré e probióticos, os quais podem inibir microrganismos patogênicos e apresentar efeito imunomodulador, além de melhorar a saúde intestinal de cães e gatos.

Segundo Gibson e Roberfroid (1995), prebiótico é um ingrediente alimentar não digestível pelas enzimas do intestino delgado que beneficia o organismo por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias no cólon, promovendo a saúde do hospedeiro. A parede de levedura autolisada pode ser utilizada como prebiótico, já que, apresenta grande quantidade de mananoligossacarídeos

(MOS). Este oligossacarídeo, pode ser fermentado no intestino de cães e reduzir a quantidade de bactérias patogênicas no intestino, (SWANSON *et al.*, 2002).

Já os probióticos, são produtos constituídos por microrganismos vivos que, uma vez introduzidos no organismo animal influenciam benéficamente o hospedeiro por meio da melhoria do balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). O *Bacillus subtilis* é um exemplo de probiótico. Esta bactéria apresenta maior resistência e estabilidade durante o armazenamento do alimento e no sistema gastrointestinal, pois é comercializada em sua forma esporulada (BIOURGE *et al.*, 1998). Assim, pode apresentar maior capacidade de colonizar o intestino dos cães.

Desta forma, serão discutidos nesta revisão os principais aspectos do uso de prebióticos e probióticos na nutrição e saúde intestinal de cães.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROBIOTA INTESTINAL DE CÃES

O primeiro sistema em várias espécies animais que é habitado por bactérias é o gastrointestinal (DENG; SWANSON, 2015). O intestino da maioria dos mamíferos é estéril ao nascimento, sendo rapidamente colonizado principalmente pelo contato materno (FAHEY *et al.*, 2008).

A microbiota intestinal tem importância na digestão e metabolismo do hospedeiro, sendo fundamental para manter a saúde geral do organismo. Pois apresentam defesas contra patógenos, como produção de substâncias antimicrobianas, controle das concentrações de oxigênio, competição por nutrientes e pH (NRC, 2006). Os microrganismos são muito abundantes em mamíferos, sua população é cerca de 10 vezes maior que o número de células que o hospedeiro tem (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Os filos predominantes de bactérias no trato gastrointestinal canino são *Firmicutes* (47,7%), *Proteobacteria* (23,3%), *Fusobacteria* (16,5%) *Bacteroidetes* (12,4%), e *Actinobacteria* (1%). Dados estes encontrados com a metodologia do gene 16S rRNA para encontrar estes gêneros em fezes de cães (DENG; SWANSON, 2015).

Outros gêneros como *Clostridium* predominam principalmente no duodeno e no jejuno, mas também podem ser bastante abundantes no íleo e cólon (SUCHODOLSKI



*et. al.*, 2008), enquanto *Fusobacteria* e *Bacteroides* são encontrados em maior quantidade no íleo e cólon (HAND *et al.*, 2013). Os lactobacilos estão presentes em todo o intestino do cão, entre eles o *Lactobacillus acidophilus* é dominante (TANG *et al.*, 2012). *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius* geralmente são encontrados no intestino de cães saudáveis (BEASLEY *et al.*, 2006).

Entre as espécies bacterianas, a *Faecalibacterium prausnitzii* é abundante na microbiota intestinal humana e animal de indivíduos saudáveis e representa mais de 5% das bactérias totais no intestino (MIQUEL *et al.*, 2013). Esta espécie é responsável pela produção do ácido graxo de cadeia curta (AGCC), com destaque ao butirato, o qual pode ser uma importante fonte de energia aos colonócitos (BJERRUM *et al.*, 2006).

De acordo com Honneffer *et al.* (2014), vários estudos têm demonstrado diferenças na microbiota intestinal entre cães saudáveis e com distúrbios gastrointestinais. Em estudos analisando a microbiota intestinal de cães com inflamação intestinal crônica, foram observados aumento nos seguintes filos e gêneros bacterianos: *Proteobacteria*, organismos semelhantes a *Escherichia coli* (XENOULIS *et al.*, 2008) ou *Pseudomonas* (SUCHODOLSKI *et al.*, 2010) e consequente redução dos gêneros *Firmicutes* e *Bacteroidetes*.

### 2.1.1 Produtos da fermentação intestinal

A microbiota intestinal pode fazer a fermentação de alguns nutrientes que não foram absorvidos no lúmen intestinal, como aminoácidos livres e carboidratos, formando outros compostos. Entre estes compostos estão sendo bastante estudados aminas biogênicas e os ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), que em excesso podem caracterizar uma microbiota não tão saudável, além de piorar o odor fecal (HUSSEIN *et al.*, 1999). Entretanto, há alguns compostos produzidos pelas bactérias que podem ser interessantes para melhorar a saúde geral deste animal de companhia. Um exemplo disso são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente os ácidos acético, butírico e propiônico.

O alimento que o cão ingere pode tanto beneficiar a saúde intestinal com a produção de AGCC quanto desenvolver compostos putrefativos, associados a processos de inflamação intestinal. Dietas com altas concentrações de proteína parecem favorecer

o crescimento de bactérias patogênicas como o *Clostridium perfringens*, além da redução de bactérias não-patogênicas (ZENTEK *et al.*, 2003). A fermentação de aminoácidos não digeridos resulta na formação de vários compostos putrefativos como fenóis, indóis, amônia, AGCR, e aminas biogênicas (HENDRIKS *et al.*, 2012).

Em contrapartida, a inclusão de prebióticos e probióticos pode favorecer o aumento populacional de bactérias não-patogênicas e consequentemente a produção dos AGCC. A inclusão de *L. fermentum* aumenta a população de bactérias ácido lácticas, reduz a produção de *Clostridium spp.* e alguns gêneros bacterianos gram-negativos (STROMPFVA *et al.*, 2017). Strompfva *et al.* (2015), observaram aumento nas concentrações de ácido propiônico com a inclusão de *L. fermentum* combinado com clolofilina. O mesmo foi observado por Swanson *et al.* (2002) com a inclusão de *Lactobacillus acidophilus* e frutooligossacarídeos (FOS) em dietas para cães. Estudo *in vitro* realizado por Vickers *et al.* (2001) constataram aumento da concentração de AGCC nas fezes de cães alimentados com diferentes fontes de inulina.

As aminas biogênicas mais conhecidas são: feniletinamina, tiramina, triptamina, histamina, putrescina, espermina, espermidina, agmatina e cadaverina. Os principais fatores que pode desencadear a formação destes compostos nos alimentos são a disponibilidade de aminoácidos livres, sinergismo entre as aminas, e presença de alguns microrganismos (SHALABY *et al.*, 1996). Espécies de bactérias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Canobacterium* são responsáveis pela produção de tiamina. Foram relacionadas ao gênero *Lactobacillus* a formação de tiramina, triptamina, feniletinamina, cadaverina e putrescina. Além disso, os *Enterococcus* foram ligados a fermentação de tiramina e fenitilamina e *Enterobacteriaceae* à cadaverina e putrescina (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999).

Os AGCC em geral, possuem capacidade antibactericida contra bactérias sensíveis ao pH ácido (KNARREBORG *et al.*, 2002) e são capazes de reduzir o pH intestinal do hospedeiro. Duas características para a redução de bactérias com potencial patogênico. Estes compostos são produtos da fermentação dos carboidratos por parte de algumas bactérias (PINA *et al.*, 2014). Os ácidos propiônico e acético são absorvidos, entram na corrente sanguínea e tem como principal função serem fonte de energia extra para o hospedeiro. Já o ácido butírico é a principal fonte de energia para os colonócitos,

importante regulador do crescimento e diferenciação celular (NRC, 2006). Os AGCC podem suprir em até 7% a energia basal em cães (HERSCHEL *et al.*, 1981) e o aumento do ácido propiônico pode reduzir a lipogênese, os níveis séricos de colesterol e a carcinogênese no cólon (HOSSEINI *et al.*, 2011).

Strompfová *et al.* (2012) relataram aumento de ácido butírico e valérico nas fezes de cães alimentados com dieta contendo 2 g de *Lactobacillus fermentum*. As espécies do gênero *Bacteroides* são capazes de produzir o propionato através do succinato (SCOTT *et al.*, 2006). Propst *et al.* (2003) observaram aumento das concentrações dos ácidos acético, butírico e propiônico com a inclusão de 3, 6 e 9 g/kg de inulina em dietas para cães. Beloshapka *et al.* (2012) obtiveram resultados parecidos com a inclusão de 5, 10 e 15g/kg de polidextrose nas dietas de cães em que foi observado aumento nos ácidos acético, propiônico e nos AGCC totais. Desta forma, é possível observar que a inclusão de pré e probióticos pode estimular a produção de AGCC e assim melhorar a saúde intestinal de cães.

## 2.2 PREBIÓTICOS

Embora o termo “prebiótico” tenha sido adotado somente em 1995 (GIBSON & ROBERFROID, 1995) os estudos sobre eles são bem mais antigos. Na década de 50, a descoberta de que o leite humano possui compostos que atuam como inibidores de adesão de bactérias patogênicas na superfície epitelial (posteriormente identificado como lactulose) e potencializam o crescimento das populações de *bifidobactérias* e *lactobacillus*, aliviando os sintomas de encefalopatia hepática em bebês (NICOLI; VIEIRA, 2000) o que incentivou outras explorações sobre o efeito do consumo de compostos não digestíveis na microbiota intestinal (FARNWORTH *et al.*, 1992).

Para manter os animais de produção com equilíbrio benéfico da microbiota do trato gastrointestinal e diminuir a mortalidade, os principais produtos adicionados na nutrição animal foram os antibióticos e quimioterápicos. Estes quando utilizados em doses subterapêuticas também tinham utilidade como promotores de crescimento (SALYERS, 1999). Crescentes estudos afirmam que estes produtos estão tornando-se ineficazes, pois são responsáveis pelo aumento da resistência de bactérias patogênicas

aos tratamentos com antibióticos na alimentação animal e humana (SPRING, 1999). Desde o ano de 2004 alguns antibióticos e quimioterápicos deixaram de ser utilizados como promotores de crescimento, quando foram proibidos pela instrução formativa nº 11, de 24 de novembro de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2004).

Os prebióticos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento para animais de produção, com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em condição de estresse (SILVA; NORBERG, 2003). Desta forma, o uso e pesquisa destes aditivos estão sendo intensificados, já que não causam nenhum prejuízo a saúde, além de poder aumentar a quantidade de microrganismos benéficos, melhorar o sistema imunológico e ainda melhoram a qualidade das fezes nos cães.

Para um aditivo zootécnico ser caracterizado como prebiótico, ele precisa ser pouco fermentável por bactérias localizadas na boca, incapacidade de digestão por parte do hospedeiro, não ser absorvível pelo intestino delgado, além de ser possivelmente fermentável por microrganismos benéficos (CRITTENDEN; PLAYENE, 2009). Estes podem ser oligossacarídeos, carboidratos de cadeia curta. Como exemplos de oligossacarídeos utilizados como prebióticos pode-se citar os glicoligossacarídeos (GOS), lactoligossacarídeos, xiloligossacarídeos (XOS), frutoligossacarídeos (FOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Alguns ingredientes podem ser usados como fontes de prebióticos, entre eles destaca-se a parede celular de levedura a qual apresenta quantidade considerável de MOS em sua composição.

A utilização de prebióticos na indústria pet food tem sido bastante difundido nos últimos anos, já que a utilização destes aditivos traz vários benefícios à saúde. Dentre estes, cabe citar a modulação da microbiota intestinal, a qual pode reduzir o risco de câncer de colón, melhorar a absorção de cálcio e auxiliar no metabolismo lipídico (ROBERFROID, 2002). O uso de alguns prebióticos como a inulina e os oligossacarídeos, por exemplo, podem estimular o sistema imunológico e reduzir os níveis de bactérias no intestino, resultando em diminuição do risco de doenças e melhora na saúde em geral (KAUR; GUPTA, 2002).

Por isso, estes aditivos tornam-se muito importantes principalmente na dieta de animais de companhia. Já que seus tutores esperam que estes animais tenham maior longevidade com saúde, pois muitas vezes são considerados membros da família. Entre os prebióticos mais utilizados para cães destacam-se os oligossacarídeos: FOS, MOS e GOS, além das suas fontes como a parede celular de levedura e a inulina. As fibras também podem ter efeito prebiótico dependendo do nível de fermentação no intestino.

A levedura é uma célula eucarionte e é utilizada no campo das ciências, medicina e biotecnologia (OSUMI, 1998). Os carboidratos presentes representam cerca de 45 a 55% da composição da sua composição, sendo 33% de trealose, 27% de glucanos, 21% de mananoligossacarídeos e 12% de glicogênio (BATTISTI *et al.*, 1985). Entre estes compostos, destacam-se os  $\beta$ -glucanos e MOS, os quais podem reduzir a colonização de bactérias patogênicas no intestino (CAMPOS NETO, 1987), tendo assim, função prebiótica. A levedura integra é obtida através da fermentação anaeróbica do melaço ou do caldo de cana, durante o processo de produção do álcool, coletada via centrifugação ou via fundos das dornas de fermentação. Posteriormente, este material é submetido a secagem (ZANUTTO *et al.*, 1999).

A levedura autolisada é extraída através da indução de autodigestão ou rompimento mecânico (ASSIS, 1996). Quando acontece a separação entre a parede de levedura e o extrato, a maior parte dos carboidratos está presente na parede da levedura, onde é extraído o MOS e o  $\beta$ - glucano. Além da inclusão de MOS, a indústria *pet food* também tem realizado a inclusão da parede de levedura autolisada com função prebiótica ou não. Já que, além desta função, a utilização de leveduras pode ser interessante para o aumento da palatabilidade, como fonte de nutrientes, para melhorar a textura, digestibilidade da dieta e para melhorar a saúde e bem-estar do animal (SWANSON; FAHEY, 2006).

A levedura autolisada apresenta em sua composição cerca de 29 a 64% de  $\beta$ -glucanos, 31% de mananoligossacarídeos, 13% de proteína, 9% de lipídios e de 1 a 2% de quitina. Entretanto, a composição pode variar de acordo com as condições de cultivo e obtenção do levedo (JAEHRING *et al.*, 2008). Por apresentar altas concentrações de  $\beta$ - glucanos e MOS, a levedura autolisada pode ser uma boa fonte prebiótica na alimentação de cães.

Os MOS são moderadamente fermentados no intestino de cães, por isso, apresentam produção moderada de AGCC (VICKERS *et al.*, 2001) e também podem aumentar a população de bactérias não patogênicas no intestino, como os *Lactobacillus*. Em relação as características fecais, este prebiótico pode reduzir os níveis de amônia (o que resultaria em fezes menos fétidas), maior matéria seca e escore fecal (FELIX *et al.*, 2009; ZENITEK *et al.*, 2002). Entretanto, sua inclusão pode reduzir a digestibilidade da dieta, já que o MOS pode ser capaz de aglutinar e ligar-se às proteínas tornando-as menos digestíveis no intestino delgado (SWANSON *et al.*, 2002), sendo interessante para dietas destinadas a cães obesos.

Já os  $\beta$ - glucanos provenientes da levedura, funcionam como agentes imunomoduladores (EL KHOURY *et al.*, 2012). Isso ocorre pelas interações específicas do  $\beta$ - glucano com várias células imunocompetentes (MEDZHITOV; JANEWAY JUNIOR, 2000). Os  $\beta$ - glucanos agem por estimulação do sistema imune e desencadeiam ações que podem ter efeito benéfico contra várias bactérias, vírus e fungos (Mantovani *et al.*, 2008). Avaliando os  $\beta$ - glucanos com administração oral em cães, Stuyven *et al.* (2010), relataram efeitos sobre a imunidade humoral, com o aumento de IgM sérica e redução de IgA no soro e nas mucosas. Zaine, (2010), realizou a suplementação de 0,015% de  $\beta$ - glucanos em dieta extrusada para cães e observou aumento nas subpopulações linfocitárias e células T citotóxicas e linfócitos B, além de aumento na resposta de hipersensibilidade tardia a inoculação da vacina polivalente e aumento na produção da citocina TNF-  $\alpha$  em sobrenadante de cultura celular de mononucleares de sangue periférico.

A adição de 1,4% de parede de levedura pode aumentar a concentração de acetato e dos AGCC totais no intestino, por causa do poder de fermentação e modulação da microbiota do MOS contido em sua parede (BELOSHAPKA *et al.*, 2012). A parede de levedura pode ter vários efeitos benéficos como imunomodulador e aumento da palatabilidade da dieta (FLEMMING, 2005).

Em relação a digestibilidade da dieta, a adição de 0,25% de parede celular de levedura em alimentos completos para cães adultos pode aumentar a digestibilidade ileal dos nutrientes (MIDDELBOSS *et al.*, 2007b). De acordo com os autores, isso aconteceu porque devido a redução da capacidade de fermentação e de substrato chegando no

intestino grosso. A suplementação da parede de levedura pode aumentar a viscosidade da dieta e desta forma, reduzir a taxa de passagem no intestino delgado. Com o quimo exposto por mais tempo neste ambiente rico em enzimas, a digestibilidade do alimento tende a aumentar. Quando analisada a digestibilidade total, esta foi reduzida quando foi suplementado a mesma quantidade da parede celular de levedura. Esta redução pode ter acontecido pelo aumento das populações bacterianas no intestino canino.

Os MOS apresentam mecanismo de ação para reduzir a população microbiana patogênica no intestino de cães através da exclusão competitiva (STRICKLING *et al.*, 2000). Este prebiótico age como receptor análogo das fimbrias tipo 1, reduzindo a colonização de patógenos com estes sítios de ligação e/ou ligando-se a microrganismos, como *Salmonella* sp. e *E. coli*. Desse modo, estas bactérias patogênicas são carregadas para fora do hospedeiro (SPRING *et al.*, 2000).

Isso acontece porque os mesmos receptores de ligação do MOS também são os receptores de bactérias com potencial patogênico. Dessa forma, o MOS reduz os sítios de ligação destas bactérias e/ou as bactérias podem ligar-se ao MOS, as quais serão carregadas para fora do hospedeiro. Por esta razão, estes microrganismos não conseguem se fixar no intestino. Esta característica foi observada por Middelbos *et al.* (2007b), os quais observaram redução de *E. coli* nas fezes de cães alimentados com dietas contendo parede de levedura.

Em geral, a suplementação prebióticos, como a levedura autolisada por exemplo, nas dietas destinadas a cães pode melhorar a saúde intestinal destes animais, pois tem a capacidade de aumentar a população de algumas bactérias benéficas como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, além do aumento na produção de AGCC e ácido láctico. Esta inclusão também pode ser benéfica para o sistema imunológico. Entretanto, estes benefícios são mais visíveis quando o animal está passando por algum desafio, pois neste caso, o nível de microbiota saudável geralmente é menor (PATRA, 2011).

## 2.3 PROBIÓTICOS

Os probióticos já são utilizados há muito tempo na alimentação. Em 1907, a Teoria de Metchnikoff (Teoria da Longevidade) mostrou a importância dos lactobacilos para a



saúde do homem. Por isso, encontramos atualmente produtos contendo probióticos em todo o mercado mundial. Lilly e Stillwell (1965) foram os primeiros a utilizar o termo probiótico, verificando a ação de microrganismos como promotores de crescimento.

A década de 70 foi marcada pelo início do uso de um probiótico para fim animal, o *Lactobacillus acidophilus*. Este fato culminou com a preocupação, por parte das autoridades e órgãos de saúde animal internacionais, com as rações animais contendo antibióticos. A preocupação resultou na interdição do uso de algumas dessas substâncias alegando que a eficácia desses componentes poderia ser diminuída quando utilizados em humanos, se administradas continuamente em animais.

Existem várias definições para probiótico, ao longo dos anos vários autores o descreveram. Foi inicialmente descrito por Lilly e Stillwell (1965), como substâncias produzidas por protozoários que estimulavam outras substâncias. Em 1974, Parker definiu probiótico como microrganismos, como bactérias e leveduras, que podem ser adicionadas à dieta com o propósito de regular a microbiota intestinal, sendo esta definição a mais consagrada atualmente.

Segundo Schrezenmeir Vrese (2001), probiótico designaria preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidades adequadas, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, e que produzem efeitos benéficos a sua saúde.

O uso de probióticos pode ser justificado pelo auxílio a manutenção da microbiota benéfica no intestino. As características essenciais para um microrganismo ser considerado probiótico são: sobreviver, crescer e se fixar ao epitélio intestinal, enfrentar condições adversas, como a produção de sais biliares, sucos gástrico, pancreático e entérico, colonizar o intestino e ter capacidade antagônica às bactérias prejudiciais (FERNANDES *et al.*, 2000).

### 2.3.1 Probióticos na nutrição de cães

A utilização de probióticos pode inibir o crescimento de microrganismos com potencial patogênico no intestino e, desta forma, reduzir a produção de compostos tóxicos, como a amônia e aminas biogênicas (CAPELLI *et al.*, 2016). Desse modo, além



de contribuir com a saúde do organismo, pode reduzir o odor fecal, o que é bastante desejável pelos tutores de cães.

Entre os probióticos utilizados pela indústria de alimentos para animais de companhia, destaca-se o uso de bactérias do gênero *Bacillus*. Essas bactérias apresentam maior resistência e estabilidade durante o armazenamento do alimento e no sistema gastrointestinal, pois são comercializadas em sua forma esporulada (BIOURGE *et al.*, 1998). Assim, apresentariam maior capacidade de chegarem viáveis no intestino dos cães.

Estas bactérias são consideradas aeróbias e podem ser produtoras de ácido láctico (KOSAZA, 1989). Este tipo de bactéria é considerado como flora transitória, já que não se estabelecem no intestino, enquanto bactérias anaeróbias como as do gênero *Lactobacilos* e *Bifidobacteria* são considerados constituintes da flora intestinal (MITSUOKA *et al.*, 1978).

A utilização do *B. subtilis* em alimentos extrusados é altamente viável, já que este microorganismo tem a capacidade de esporulação. Desta forma, pode apresentar estabilidade por mais tempo nas dietas comerciais destinadas a cães. Além disso, também são estáveis quando estão no estômago e não são susceptíveis a ação do ácido clorídrico (KOSAZA, 1989). Por causa deste mecanismo o *B. subtilis* consegue alcançar o intestino sem perder a sua eficácia.

Em estudo realizado para verificar a viabilidade do *B. subtilis* no processo de extrusão, foi observada a redução de 99% do probiótico na dieta. Quando o foi aplicado um pó de revestimento, 60% dos microorganismos sobreviveram. Estas perdas podem ter ocorrido devido aos esporos aprisionados dentro da fração lipídica da dieta. Mesmo com esta perda, o revestimento em pó pode ser eficiente para adicionar o *B. subtilis* à dieta antes da extrusão. Após o processamento, as dietas foram acompanhadas pelo período de 12 meses e constatou-se a perda de 25% ao longo deste período. No mesmo estudo foram realizadas mensurações para observar se o *B. subtilis* permaneceu vivo no trato gastrointestinal de cães. Os primeiros microorganismos observados nas fezes foram em um período de 24 horas após a primeira alimentação e atingiram um platô de 2 a 4 dias. Após a retirada da dieta com o probiótico, este desapareceu das fezes 3 dias após a última alimentação com o microorganismo. Levando em consideração estes

resultados é possível observar que o *B. subtilis* sobrevive e chega até o intestino, porém a sua suplementação deve ser contínua (BIOURGE et al., 1998).

Felix et al. (2010), relataram que a inclusão de 0,01% de *Bacillus subtilis* em alimentos para cães adultos reduz as concentrações de amônia nas fezes. Isso pode ter acontecido pela redução da microbiota com potencial patogênico pela inclusão deste probiótico. Entretanto, os autores não observaram redução de pH e isto pode ter acontecido pois o *Bacillus subtilis* tem uma fermentação limitada em relação a outras bactérias, como por exemplo o gênero *Lactobacillus*.

O mesmo probiótico foi suplementado em cães filhotes com diarreia e Paap et al. (2016) observaram melhora no quadro clínico. A administração de 0,5g/100g da dieta baseada na matéria seca de *Bacillus subtilis* também deixou as fezes menos fétidas e reduziu a quantidade de gases no intestino. Estes autores também correlacionam esta melhora a alteração que o *B. subtilis* pode ter realizado na microbiota intestinal. Já que, a melhora nas características fecais pode indicar boa saúde intestinal nos cães. A interação entre *Bacillus amyloliquefaciens* e *Enterococcus faecium* também foi capaz de reduzir as populações patogênicas, como clostrídios no intestino de cães (GONZÁLES-ORTIZ et al., 2013).

Outro probiótico muito estudado em nutrição de cães é o gênero *Lactobacillus*. A suplementação de 2g de *L. fermentum* pode ser benéfico para a saúde intestinal de cães, já que pode reduzir a população de bactérias do gênero clostridium e desta forma prevenir doenças como as causadas por *C. difficile* ou *C. perfringens*. Esta redução pode ser impacto do aumento da produção de alguns AGCC (ácidos acético, propiônico e butírico) e ácido láctico pelas bactérias não patogênicas, o que também fez com que houvesse redução no pH fecal (STROMPFOVÁ et al., 2012). Além disso, a inclusão de *L. fermentum* nas dietas para cães pode melhorar a consistência fecal de animais com diarreia, estímulo do sistema imune e a modulação da microbiota (STROMPFOVÁ et al., 2017).

Existem algumas teorias de como os probióticos agem em benefício do hospedeiro. Uma delas é em relação a competição por sítios de ligação. Neste caso, estes microrganismos apresentam receptores ou pontos de ligação na mucosa intestinal

e com esta ligação formam uma barreira que impede a ligação de bactérias patogênicas, que acabam sendo eliminadas (FULLER, 1991).

Outro mecanismo de ação que pode ser utilizado pelas bactérias probióticas é a competição por nutrientes. Quando o intestino já está colonizado por bactérias não patogênicas fica mais difícil a fixação de microrganismos patogênicos pela competição existente entre eles (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Já, o estímulo do sistema imune pode ser dado principalmente pelos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, os quais podem estimular a produção de anticorpos, células T, ativação de macrófagos e produção de interferon (FULLER, 1991).

Por último a ação dos probióticos pode ser realizada com a produção de substâncias antibacterianas. Entre elas, as bactérias ácido lácticas podem produzir nisina, diplococcina, lactocidina e reuterina. Estas substâncias são responsáveis pela inibição de bactérias gram-negativas e gram-positivas (LIMA et al., 2007). Além disso, outro mecanismo para inibir as bactérias patogênicas pode ser a produção de AGCC e ácido láctico. Estes ácidos tendem a reduzir o pH intestinal, o que seria suficiente para reduzir a população de bactérias gram-negativas (KURDI et al., 2006).

Dessa forma, os probióticos são excelentes aditivos para melhorar o bem-estar de animais de companhia, já que, podem influenciar positivamente na nutrição de cães saudáveis ou que apresentem alguma enfermidade do TGI (GRZESKOWIAK et al., 2015).

### **3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O equilíbrio da microbiota intestinal de cães é de extrema importância para manter a saúde geral destes animais. Alterações na dieta podem ocasionar mudanças significativas na população microbiana e tornar estes animais mais susceptíveis à doenças. Para manter a saúde e longevidade destes animais de companhia é possível fazer a inclusão de alguns aditivos na dieta.

O uso de pro e prebióticos pode modular a microbiota intestinal de forma a reduzir o risco de contrair alguma doença ligada as bactérias patogênicas, como inflamações intestinais e diarreias, por exemplo. Além disso, o uso destes ingredientes pode favorecer a produção do AGCC, benéficos para a saúde geral de cães e a redução de compostos putrefativos, que são responsáveis pelo aumento da produção de gases e odor das fezes.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, E. M. Componentes da parede celular de leveduras: proteínas e polissacarídeos de interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos. WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, 1996, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: ITAL, 1996, p. 41-51.

Association of American Feed Control Officials – AAFCO. Dog and cat nutrient profiles. **Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated**. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

BATTISTI, J.A. Composição química e valores energéticos de alguns alimentos para suínos com diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.14, p.141-150, 1985.

Beasley, S.S.; Manninen, T.J.K.; Saris, P.E.J. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces, J. **Advances in Applied Microbiology**, v. 101, p. 131e138, 2006.

Benno Y.; Nakao H.; Uchida K.; Mitsuoka T. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p. 703-706, 1992.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B.; FINSTER, K.; AND PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v.85 n.7, p.1151-1164, 2006.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, n.1, p.33-41, 1999.

Biourge V.; Vallet C.; Levesque A.; Sergheraert R.; Chevalier S.; Robertson JL. 1998. The use of probiotics in the diet of dogs. **The Journal of Nutrition**, v.128, p.2730-2732, 1998. CAMPOS NETO, O. Utilização dos subprodutos da indústria sucroalcooleira na alimentação animal. SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL, 1987, Brasília, DF. **Anais...**1987, p.129-152.

COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e Resposta Imune. **Ciência Rural**, RS, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CAPELLI, S.; MANICA, E.; HASHIMOTO, J.H. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.10, n. 3, p.212-223, 2016.

Crittenden R.; Playne MJ. Prebiotics. In: Lee YK, Salminen S. Handbook of Prebiotics and Probiotics 2th ed. New Jersey: John Wiley & Sons p.535-581, 2009.

DENG, P.; SWANSON, K.S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p.6-17, 2015.

EL KHOURY, D.; CUDAH, C.A.; LUHOVYY, B.L.; ANDERSON, G.H. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p. 1-28, 2012.

FAHEY, G.C.; MERCHEN, N.R.; CORBIN, J.E.; HAMILTON, A.K.; SERBE, K.A.; LEWIS, S.M.; HIRAKAWA, D.A. Levels of dietary beet pulp on nutrient intake. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4221-4228, 1990b.

FAHEY JUNIOR, G. C.; BARRY, K. A.; SWANSON, K. S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **The Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FARNWORTH, E.R.; MODLER, H.W.; JONES, J.D.; CAVE, N.; YAMAZAKI, H.; RAO, A.V. Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, n.12, p.977-980, 1992.

FÉLIX, A.P.; TEIXEIRA NETTO, M. V.; MURAKAMI, F. Y.; BRITO, C. B. M.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and fecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. **Ciência Rural**, v.40, n. 10, p. 2169-2173, 2010.

FELIX, A.P.; BRITO, C.B.M.; ZANATTA, C.P.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Supplementation of fructooligosaccharides (FOS) on faecal characteristics of adult dogs. **Archives of veterinary Science**, v.18, n.1, p.9-14, 2013a.

FERNANDES, P.C.C.; SILVA, A.V.; RODRIGUEZ, N.M.; FERREIRA, C.L.L.F.; Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães. **Disponível em:** <http://www.vetnil.com.br/idiomas/wp-content/uploads/2012/05/viabilidade.pdf>. Acesso em: 22/01/2019.

FLEMMING, J.S. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary science**, v.14, n.1, p.31-35, 2009.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-442, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GONZÁLES-ORTIZ, G.; CASTILLEJOS, L.; MALLO, J.J.; CALVO-TORRAS, M.A.; BAUCCELLS, M.D. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v.67, n.5, p.406-415, 2013.

GRZESKOWIAK, L.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v.34, p. 14-23, 2015.

HAND, D.; WALLIS, C.; COLYER, A.; PENN, C.W. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. **PLoS One** 8, ed.53115, 2013.

HENDRIKS, W.H.; VAN BAAL, J.; BOSCH, G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species viem. **The British Journal of Nutrition**, v.108, n.S2, p.247-257, 2012.

HUSSEIN, S.H. *et al.* Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1454-1456, 1999.

JAEHRING, S.C., ROHN, S., KROH L.W., WILDENAUER, F.X., LISDAT, F., FLEISCHER, L.G., KURZ, T. Antioxidative activity of (1;3), (1;6)- $\beta$ -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. **Food Science and Technology**, Davis, v. 41, n. 5, p. 877, 2008.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 103–107, 2007.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v.27, p.703-714, 2002.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, v.8, n.2, p.517-531, 1989.

KURDI, P.; KAWANISHI, K.; MIZUTANI, K.; YOKOTA, A. Mechanism of Growth Inhibition by Free Bile Acids in Lactobacilli and Bifidobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1979–1986, 2006.

LILLY, D.M; STILLWEL, R.H. Probiotics grow promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004.**



MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R. Beta Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v.658, n.3, p.154-161, 2008.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JUNIOR, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v.343, n.5, p.338-344, 2000.

MIDDELBOSS, I.S.; GODOY, M. R.; FASTINGER, N. D.; FARREY JR, G. C. A dose-response evaluation of spray dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3022- 3032, 2007b.

MITSUOKA T. Intestinal bacterial flora and productivity in domestic animals (I). J. Jpn. vet. med. Ass., v.31, p.199-207, 1978.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition: **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**, Rev. National Academies Press, Washington, DC. 2006.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje, São Paulo**, v.28, n.163, p.34.38, 2000.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall formation and structure. **Micron**, v.29, n.2/3, p. 207-233, 1998.

PAAP, P.M; VAN DER LAAK, J.H.; SMIT, J.I; NAKAMURA, N.; BEYNEN, A.C. Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve feces consistency in dogs with chronic diarrhea. **Research opinions in animal and veterinary sciences**, v.6, p.8, p.256-260, 2016.

PRATRA, A.K. Responses of feeding prebiotics on nutrient digestibility, faecal microbiota composition and short-chain fatty acid concentrations in dogs: a meta-analysis. **The Animal Consortium**. v.5, n.11, p.1743-1750, 2011.

PROPST, E.L., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., MERCHEN, N.R., FAHEY JR., G.C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v.81 p.3057-3066, 2003.

SCOTT, K.P.; MARTIN, J.C.; CAMPBELL, G.; MAYER, C.D.; FLINT, H.J. Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium *Roseburia inulinivorans*. **Journal of Bacteriol**, v.188, p.4340-4349, 2006.

SHABALY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, n7, p.675-690, 1996.



SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K. E. The effects of mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in the ceca on *Salmonella* challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205-211, 2000.

STRICKLING, J.A.; HARMON, D.L.; DAWSON, K.A.; GROSS, K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

STROMPF OVÁ, V.; KUBASOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.010, n.16, p.6309-6319, 2017.

STROMPF OVÁ V.; KUBAŠOVÁ I.; FARBÁKOVÁ J.; GANCARČÍKOVÁ S.; MUDROŇOVÁ D.; MAĎARI A.; LAUKOVÁ A. Experimental application of *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 in combination with chlorophyllin in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.20 p.8681-8690, 2015.

STROMPF OVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.; GANCARCIKOVA, S. Effectivity of freeze-dried form of *Lactobacillus fermentum* AD1-CCM7421 in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, n.4, p.347-350, 2012.

SWANSON, K.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; CHOW, J.; WOLF, B.W. GARLEB, K.A.; FAHEY, G.C. Fructooligosaccharides and lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.3721–3731, 2002a.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G.C. Jr. Portential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition**, p.19-35, 2006.

SILVA, E. N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000, p. 241-251.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p.S105-S110, 2002.

SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G.; FEDALTO, L.M., BORGES, S.A.; SILVA, A.V.; PEDROSO, A.C. Efeitos de antimicrobianos, probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho e morfologia do jejuno de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n.4, p. 35, 2002.

SUNVOLD, G.D.; FAHEY, G.C.; MERCHEN, N.R.; TITGEMEYER, E.C.; BOURQUIN, L.D.; BAUER, L.L.; REINHART, G.A. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of

selected fiber sources by dog fecal inoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber supplemented diets. **Journal of Animal Science**, v.73, n.4, p.1099–1109, 1995.

SUCHODOLSKI J.S.; XENOULIS P.G.; PADDOCK C.G.; STEINER J.M.; JERGENS A.E. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Veterinary Microbiology**, v.142, n.3 p.394–400, 2010.

SUCHODOLSKI, J.S.; CAMACHO, J.; STEINER, J.M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v.66, n.3, p.567–578, 2008.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G.C. Jr. Potential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition** p.19–35, 2006.

TANG, Y.; MANNINEN, T.J.K.; SARIS, P.E.J. Dominance of *Lactobacillus acidophilus* in the facultative jejunal *Lactobacillus* microbiota of fistulated beagles, **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78 p.7156–7159, 2012.

VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D., KELLEY, R.L., REINHART, G.A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.609–615, 2001.

XENOULIS, P.G.; PALCULICT, B.; ALLENSPACH, K.; STEINER, J.M.; VAN HOUSE, A.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. **FEMS Microbiology Ecology**, 2008; v.66, n.3, p.579–589, 2008.

ZANUTO, C.A.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C.; SCAPNELLO, C.; MURAKAMI, A.E. Utilização da levedura de recuperação (*Saccharomyces sp.*), seca por rolos rotativos ou por *spray-dry*, na alimentação de leitões na fase inicial. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 705–710, 1999.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLEVRE, O.; ROCHAT, F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n.11–12, p.397–407, 2003.

## **CAPITULO II – Utilização de levedura autolisada sobre a digestibilidade da dieta, produtos de fermentação intestinal e preferência alimentar de cães**

### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar a inclusão de levedura autolisada (*Saccharomyces cerevisiae*), de duas diferentes formas, na dieta de cães, sobre a digestibilidade da dieta, produtos de fermentação intestinal e preferência alimentar. As dietas avaliadas foram: Controle, sem adição de levedura (CO); Dieta CO + 1% de levedura autolisada adicionada na massa (1%M) e Dieta CO + 1% de levedura autolisada adicionada por cobertura (1%C). Para digestibilidade e produtos de fermentação intestinal, foram utilizados 15 cães adultos da raça Beagle, distribuídos inteiramente ao acaso, com 5 repetições por tratamento. Os cães foram alimentados durante 30 dias com as dietas experimentais (n=5), sendo 20 dias de adaptação e 5 dias de coleta total de fezes. No teste de preferência alimentar foram utilizados 16 cães e realizados as seguintes comparações: CO vs 1%M; CO vs 1%C e 1%M vs 1%C. Cada teste foi realizado por um período de 2 dias, totalizando 32 repetições. Não houve diferença entre os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) e energia metabolizável (EM) das dietas e os produtos de fermentação intestinal dos cães ( $P>0,05$ ). Houve maior número de primeiras escolhas para a dieta 1%C, em relação às demais dietas ( $P<0,05$ ). Para a razão de ingestão, nos testes entre os tratamentos CO vs 1%M e CO vs 1%C os cães consumiram maior quantidade da dieta CO e 1%C ( $P<0,01$ ), respectivamente. A inclusão de 1% de levedura autolisada em cobertura aumenta a palatabilidade de alimentos destinados a cães em relação à dieta controle. Entretanto, a inclusão tanto em massa quanto em cobertura não altera a digestibilidade e os produtos de fermentação intestinal em cães.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos de cadeia curta, Prebiótico, Primeira escolha, Saúde intestinal.

## **Use of autolysed yeast on diet digestibility, intestinal fermentation products and dog food selection**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the inclusion of autolysed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), in two different ways, in the diet of dogs, on diet digestibility, intestinal fermentation products and food preference. The diets evaluated were: Control, without addition of yeast (CO); Diet CO + 1% of autolysed yeast added in the mass (1% M) and Diet CO + 1% of autolysed yeast added by coverage (1% C). For digestibility and intestinal fermentation products, 15 adult beagle dogs were used, randomly distributed with 5 replicates per treatment. Dogs were fed for 30 days with experimental diets ( $n = 5$ ), with 20 days of adaptation and 5 days of total collection of feces. In the food preference test, 16 dogs were used and the following comparisons were made: CO vs 1% M; CO vs 1% C and 1% M vs 1% C. Each test was performed for a period of 2 days, totaling 32 replicates. There was no difference between the apparent digestibility coefficients (CDA) and metabolizable energy (ME) of the diets and the intestinal fermentation products of the dogs ( $P > 0.05$ ). There were more first choices for the 1% C diet, in relation to the other diets ( $P < 0.05$ ). For the intake ratio, in the tests between CO treatments vs. 1% M and CO vs 1% C the dogs consumed a greater amount of diet CO and 1% C ( $P < 0.01$ ), respectively. The inclusion of 1% of autolysed yeast in cover increases the palatability of foods destined to dogs in relation to the control diet. However, inclusion both in bulk and in cover does not alter the digestibility and intestinal fermentation products in dogs.

**Key words:** Short-chain fatty acids, Prebiotic, First choice, Intestinal health.

## 1 - INTRODUÇÃO

A fim de garantir bem-estar e longevidade aos cães, muitos aditivos funcionais vêm sendo utilizados nas dietas comerciais destinadas a estes animais. Entre eles destacam-se os prebióticos, que são, carboidratos não digestíveis pelo organismo animal, mas que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de microrganismos benéficos (BIAGI, 2014).

A levedura autolisada foi utilizada nesse estudo pela composição de proteínas de alta digestibilidade, peptídeos, nucleotídeos, enzimas e vitaminas do complexo B, presentes no citoplasma (ICC, 2010). Dentre estes componentes, o ácido glutâmico presente em alta concentração pode aumentar a palatabilidade da dieta (FLEMMING, 2005).

Além da função nutricional, a levedura autolisada apresenta maior disponibilidade e concentração dos seus componentes da parede celular, como os mananoligossacarídeos (MOS) e beta-glucanos. Isso acontece pelo estresse que a célula sofre durante o processo de produção do etanol e como forma de defesa a levedura aumenta a quantidade de carboidratos para aumentar a rigidez da parede celular (KNORR, *et al.*, 1979).

Os MOS podem ser fermentados no intestino de cães e apresentam produção moderada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (VICKERS *et al.*, 2001) e podem aumentar a população de bactérias não patogênicas, como os lactobacilos e reduzir as com potencial patogênico no intestino (SWANSON *et al.*, 2002). Além disso, outros efeitos são relatados com a inclusão de levedura autolisada na alimentação de cães, como efeito imunomodulador causado pelo MOS e beta-glucanos (FLEMMING, 2005).

Desta forma, espera-se que a inclusão da levedura autolisada na dieta melhore a palatabilidade, além de aspectos relacionados à saúde intestinal dos cães, reduzindo a produção de compostos nitrogenados tóxicos no intestino e contribuindo com as características fecais. No entanto, considerando que a maioria dos alimentos comerciais para cães são submetidos à altas temperaturas durante a extrusão e a secagem, não se sabe ao certo se há influência do processo sobre a funcionalidade das leveduras como prebiótico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a digestibilidade dos nutrientes e

energia, os produtos da fermentação intestinal e a preferência alimentar de cães alimentados com dietas contendo levedura autolisada em duas diferentes formas de aplicação, na massa ou em cobertura.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais do setor de Ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil (051/2016).

### 2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram avaliadas três dietas experimentais, sendo uma dieta controle (CO), sem adição de levedura autolisada, uma dieta contendo 1% de levedura autolisada de cana de açúcar adicionada na massa (1%M), antes da extrusão e uma terceira dieta contendo 1% de levedura autolisada de cana de açúcar adicionada em cobertura (1%C), após o processo de extrusão (Tabela 1). A levedura autolisada da dieta 1%C foi aplicada em cobertura após a extrusão, juntamente com o óleo, sendo este, aplicado em todos os tratamentos na mesma quantidade.

Tabela 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA AUTOLISADA E DAS DIETAS EXPERIMENTAIS COM BASE NA MATÉRIA SECA.

%	Levedura autolisada <sup>1</sup>	CO	1%M	1%C
Umidade	5,00	8,01	7,73	8,77
Proteína Bruta	38,00	24,54	23,76	24,84
Extrato etéreo em hidrólise ácida	2,50	13,44	13,33	13,42
Matéria Mineral	5,00	9,03	10,21	9,30
Fibra Bruta	1,50	2,49	2,39	2,31
Energia Bruta (kcal/kg)	-	4739,94	4738,99	4753,20
Cálcio	0,17	1,92	2,19	1,88
Fósforo	0,56	1,30	1,45	1,28

<sup>1</sup> Composição padrão; CO = controle; 1%M = 1% de levedura na massa; 1%C = 1% de levedura aplicada por cobertura.

## 2.2 EXPERIMENTO I: DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECAIS

### 2.2.1 Animais e instalações

Foram utilizados 15 cães adultos (oito machos e sete fêmeas) da raça Beagle com um ano de idade, pesando  $8,9 \pm 1,1$  kg. Os animais foram alojados em baias de alvenaria com solário de 2 x 5 m, vacinados, desverminados e previamente submetidos à exames clínicos que atestaram seu estado de higidez.

### 2.2.2 Procedimentos Experimentais

O ensaio de digestibilidade foi conduzido pelo método da coleta total de fezes, considerando as recomendações da AAFCO (2004). As dietas foram oferecidas por um período de adaptação de 20 dias seguidos por cinco dias de coleta total de fezes.

Os alimentos foram ofertados duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 horas), em quantidade suficiente para atender as necessidades de energia metabolizável (NEM) de cada animal segundo o NRC (2006) e o fornecimento de água foi à vontade.

As fezes foram colhidas, pesadas duas vezes por dia e armazenadas em potes plásticos individuais, previamente identificados, tampados e em freezer a  $-21^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores. Ao final do período de coleta, o composto de fezes de cada animal foi seco em estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil), por 72 horas e posteriormente moídos em moinho de martelos Willey (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA), com peneiras de crivos de 1 mm foi seco em estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil), por 72 horas. As fezes foram moídas com peneiras de crivos de 1 mm em moinho de martelos Willey (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA).

As dietas e fezes foram submetidas a análises químicas de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB, método 954.01) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA, método 954.02), segundo a AOAC (1995). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (Parr Instrument Co., Model 1261, Moline, IL, USA). Com base nos resultados laboratoriais obtidos foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e a energia metabolizável (EM) das dietas, segundo a AAFCO (2004):

$CDA = [(g \text{ nutriente ingerido} - g \text{ nutriente excretado}) / g \text{ nutriente ingerido}] \times 100.$

$EM (kcal.g^{-1}) = \{kcal.g^{-1} \text{ EB ingerida} - kcal.g^{-1} \text{ EB excretada nas fezes} - [(g \text{ PB ingerida} - g \text{ PB excretada nas fezes}) \times 1,25 \text{ kcal.g}^{-1}]\} / g \text{ ração ingerida}.$

As características das fezes foram avaliadas pelo teor de matéria seca (MSf), escore fecal, concentração de amônia, pH fecal, odor fecal, ácido siálico e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ramificada (AGCR). O pH fecal e a concentração de amônia foram analisados em fezes coletadas no máximo 15 minutos após a defecação. O escore fecal foi avaliado sempre pelo mesmo pesquisador, atribuindo-se notas de 1 a 5, sendo: 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias e mal formadas; 3 = fezes macias, formadas e úmidas; 4 = fezes bem formadas e consistentes; 5 = fezes bem formadas, duras e secas, de acordo com Carciofi et al. (2009).

O pH fecal foi mensurado por meio de um pHmêtro digital (331, Politeste Instrumentos de Teste Ltda, São Paulo, SP, Brasil) utilizando 3,0 g de fezes frescas diluídas com 30 mL de água destilada. A concentração de amônia nas fezes foi determinada de acordo com Félix et al. (2013).

O odor fecal foi avaliado por 50 voluntários que compararam as fezes frescas dos animais alimentados com as dietas do experimento. As fezes foram coletadas de dois animais de cada tratamento e então 5 g de cada animal foram homogeneizados e armazenados em um pote plástico, que foi tampado com papel filme com 36 furos. Os voluntários deram notas de 1 a 3 para os odores dos potes contendo os tratamentos CO, 1%M e 1%C, sendo que as notas significavam: 1 - odor melhor (menos fétido/menos intenso) que a controle, 2 - igual a controle e 3 - pior (mais fétido/mais intenso) que a controle.

Para determinação dos AGCC e AGCR, as fezes dos animais foram coletadas frescas, no máximo 15 minutos após a defecação. Em um recipiente plástico devidamente identificado e com tampa, 10 g de amostra de fezes foram pesadas e misturadas com 30 mL de ácido fórmico 16%, homogeneizadas e armazenadas em geladeira a 4°C por um período de 3 a 5 dias. Após esse período, estas soluções foram centrifugadas a 5000 rotações por minuto em centrífuga (2K15, Sigma, Osterodeam Hans, Alemanha) por 15 minutos. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi separado e submetido a nova centrifugação. Cada amostra passou por três centrifugações e ao



final da última, parte do sobrenadante foi transferida para um eppendorff devidamente identificado para posterior congelamento. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e passaram por uma nova centrifugação a 14000 rotações por minuto por 15 minutos (Rotanta 460 Robotic, Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Os AGCC e AGCR fecais foram analisados por cromatografia gasosa (SHIMADZU, modelo GC-2014, Quioto, Japão). Utilizou-se uma coluna de vidro (Agilent Technologies, HP INNO wax – 19091N, Santa Clara, EUA) de 30 m de comprimento e 0,32 mm de largura. O nitrogênio foi o gás transportador, com uma taxa de fluxo de 3,18 ml/min. As temperaturas de trabalho foram 200°C na injeção, 240°C na coluna (na velocidade de 20°C/min) e 250°C no detector de ionização de chama.

Para análise de ácido siálico, as fezes foram secas em liofilizador (Alpha 1-4 LO plus, Christ, Osterodeam Hans, Alemanha) e a análise feita de acordo com Jourdian et al. (1971).

### 2.2.3 Desenho experimental e análise estatística

O experimento foi analisado segundo delineamento inteiramente casualizado, totalizando em cinco repetições por tratamento. Os dados foram previamente analisados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Quando essas premissas foram atendidas os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1996). As médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Caso os dados não apresentassem distribuição normal, estes foram analisados pelo teste Kruskal Wallis, à 5% de probabilidade.

## 2.3 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE

### 2.3.1 Animais e instalações

Foram utilizados 16 cães adultos (oito machos e oito fêmeas) da raça Beagle com um ano de idade, pesando  $8,9 \pm 1,1$  kg. Os animais foram alojados em baias de alvenaria com solário de 2 x 5 m, vacinados, desverminados e previamente submetidos à exames clínicos que atestaram seu estado de higidez.

### 2.3.2 Procedimentos experimentais

O ensaio de palatabilidade foi composto por três testes realizados em dois dias consecutivos cada e as dietas avaliadas testaram o efeito da adição da levedura autolisada por cobertura ou inclusão na massa. Para isso, comparou-se as dietas CO vs. 1%M; CO vs. 1%C; 1%M vs. 1%C, totalizando 32 repetições por teste. A cada alimentação, os animais receberam quantidade de cada dieta 30% superior às suas necessidades energéticas, com base na fórmula para cães adultos em manutenção do NRC (2006), assegurando assim a presença de sobras.

Os alimentos foram fornecidos uma vez ao dia às 08:00 horas, cada animal recebeu dois potes, cada um contendo uma das dietas avaliadas. Assim que uma das dietas era consumida completamente, ambos os potes eram retirados e as sobras quantificadas. A posição relativa dos comedouros foi alternada no segundo dia de experimento para que não houvesse o condicionamento do animal ao local de alimentação.

A primeira escolha foi definida pelo registro do primeiro pote que o animal se aproximou durante a oferta simultânea dos alimentos. A razão de ingestão foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Razão de ingestão} = \left[ \frac{\text{g ingeridas da dieta A ou B}}{\text{g totais consumidas (A + B)}} \right] \times 100$$

A preferência alimentar foi determinada pela associação dos testes de razão de ingestão e primeira escolha entre as rações ofertadas aos cães.

### 2.3.3 Desenho experimental e análise estatística

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado. Foram utilizados 16 animais totalizando 32 repetições por teste (16 cães x 2 dias). Os dados de primeira escolha foram submetidos ao teste de Qui-quadrado e a razão de ingestão ao teste t-Student, ambos a 5% de probabilidade.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 EXPERIMENTO I: ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECAIS

A inclusão da levedura autolisada em massa e em cobertura não alterou os CDA dos nutrientes e a EM das dietas ( $P>0,05$ , Tabela 2). Também não houve alteração ( $P>0,05$ ) nos produtos de fermentação intestinal e características fecais dos cães (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - MÉDIA DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA, %), ENERGIA METABOLIZÁVEL (EM, KCAL/KG) E CARACTERÍSTICAS FECAIS DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETA CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBERTURA.

Item	CO	1%M	1%C	EPM	P
CDA					
Matéria seca	71,45	67,30	68,46	0,97	0,206
Matéria Orgânica	79,61	76,41	77,20	0,74	0,189
Proteína Bruta	81,69	77,27	78,39	0,81	0,056
Extrato etéreo	83,90	82,25	77,52	0,65	0,563
Energia Metabolizável	3466,30	3336,20	3368,80	32,08	0,239
Características fecais					
NH <sub>3</sub> (%)	0,06	0,06	0,07	0,001	0,214
Matéria seca (%)	38,56	39,51	39,37	0,84	0,903
pH	7,06	7,40	7,00	0,09	0,181
Ác. Siálico*	2,41	2,60	2,54	0,051	0,315
AGCC**					
Acético	19,65	20,69	20,27	1,05	0,931
Propiônico	11,97	13,76	13,17	0,69	0,542
Butírico	3,88	3,10	3,28	0,40	0,740
Total AGCC	35,50	37,55	36,72	2,03	0,914
AGCR***					
Isobutírico	0,63	0,65	0,59	0,03	0,365
Isovalérico	0,75	0,78	0,75	0,04	0,950
Valérico	0,21	0,26	0,19	0,02	0,770
Total AGCR	1,59	1,69	1,53	0,07	0,653

EPM: Erro padrão da média, P: probabilidade; NH<sub>3</sub>: nitrogênio amoniacal (%) \*  $\mu\text{mol/g}$  amostra, \*\*Ácidos graxos de cadeia curta ( $\mu\text{mol/g}$  de fezes na matéria seca), \*\*\*Ácidos graxos de cadeia ramificada ( $\mu\text{mol/g}$  de fezes na matéria seca).

Tabela 3 - MEDIANAS DE ESCORE FECAL E ODOR FECAL DE CÃES ALIMENTADOS COM DIETAS CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBERTURA (1%C).

Item	CO	1% M	1% C	P
Escore	4	4	4	0,171
Odor	2	3	2	0,517

P: Probabilidade; Escore fecal: 1 = fezes líquidas a 3 = fezes secas; Odor fecal: 1 = melhor que o controle; 2 = igual ao controle e 3 = pior que o controle

### 3.2 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE

A razão de ingestão foi maior para o tratamento CO, quando comparado ao tratamento 1%M e para o tratamento 1%C em comparação a dieta CO ( $P < 0,001$ ). Na avaliação de primeira escolha, CO vs 1%C e 1%M vs 1%C ( $P < 0,001$ ) os cães foram primeiro ao comedouro da dieta 1%C, em ambos os testes (Tabela 4).

Tabela 4 - PRIMEIRA ESCOLHA DA DIETA A (N) E RAZÃO DE INGESTÃO (RI + ERRO PADRÃO) DAS DIETAS CONTROLE (CO), 1% DE LEVEDURA AUTOLISADA APLICADA NA MASSA (1%M) E 1% DE LEVEDURA APLICADA EM COBERTURA (1%C).

Dieta A vs. B	nA	nB	RI A	RI B	P <sub>RI</sub>	P <sub>escolha</sub>
CO vs 1%M *	10	22	0,67 $\pm$ 0,22	0,33 $\pm$ 0,22	<0,001	0,113
CO vs 1%C *	25	7	0,33 $\pm$ 0,27	0,67 $\pm$ 0,27	<0,001	<0,001
1%M vs 1%C	25	7	0,43 $\pm$ 0,23	0,57 $\pm$ 0,23	0,995	0,001

\*Valor de  $P < 0,05$  para o número de visitas para a dieta A pelo teste de qui-quadrado e RI teste t-Student; RI: [g da dieta A ou B/g total da dieta oferecida (A + B)].

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 EXPERIMENTO I: ENSAIO DE DIGESTIBILIDADE E CARACTERÍSTICAS FECALIS

Os resultados encontrados na literatura sobre a digestibilidade dos nutrientes, de dietas suplementadas com derivados de leveduras em cães são controversos. Middelbos *et al.* (2007b) relataram aumento da digestibilidade ileal dos nutrientes em cães alimentados com níveis crescentes de parede celular de levedura até 0,25%. Entretanto, para digestibilidade total aparente, a qual também foi realizada no presente estudo, houve redução dos CDA e EM. Para os autores supracitados, esta redução pode ter ocorrido pelo aumento de bactérias que acidificam o intestino. Com o aumento da população microbiana pode ocorrer a redução da digestibilidade da PB e consequentemente da MO e MS, pela maior excreção de bactérias nas fezes. Desta forma, a ausência de resultados significativos neste estudo pode estar relacionada a digestibilidade total aparente.

A inclusão de MOS pode reduzir a digestibilidade da dieta, já que este prebiótico pode ser capaz de aglutinar e ligar-se às proteínas tornando-as menos digestíveis no intestino delgado (SWANSON *et al.*, 2002). Este comportamento não foi observado neste trabalho com a inclusão de parede de levedura como fonte de MOS.

Alvim (2001) testou a extrusão de 5% de levedura autolisada em conjunção com farinha de milho. A autora relata que o processamento deste material reduziu o grau de gelatinização do amido. Isto pode refletir em menor digestibilidade das dietas. Entretanto, não houve diferença na digestibilidade das dietas em cães alimentados com os tratamentos 1%M e 1%C, indicando que a levedura autolisada e o nível desta utilizada neste estudo não influenciou negativamente o processamento das dietas.

Não houve alteração nas características fecais e produtos de fermentação intestinal analisados. O MOS age como receptor análogo das fímbrias tipo 1, reduzindo a colonização de patógenos com estas fímbrias e/ou ligando-se a microrganismos, como *Salmonella* sp. e *E. coli*. Desse modo, estas bactérias patogênicas são carregadas para fora do hospedeiro (SPRING *et al.*, 2000). Consequentemente o MOS pode reduzir a população microbiana com potencial patogênico em geral no intestino de cães (STRICKLING *et al.*, 2000). Por isso, a inclusão deste prebiótico poderia resultar em menores níveis de amônia e AGCR nas fezes, já que as bactérias com potencial patogênico seriam as maiores produtoras deste composto.

Entretanto, neste estudo, não houve diferença para os níveis de amônia nas fezes. Isso pode ter ocorrido pela inclusão da levedura autolisada utilizada neste trabalho não apresentar quantidade suficiente de MOS para obter tal resultado. Estes dados não corroboram com os de Felix *et al.* (2009) e Zentek *et al.* (2002), que observaram redução nos níveis de amônia, maior MSf e escore fecal para cães alimentados com dietas contendo MOS, em relação a dieta controle.

Em relação a MSf, a inclusão de MOS pode reduzir a umidade das fezes, já que estimula a produção de AGCC pelas bactérias não-patogênicas. Estes AGCC contribuem com a absorção de água no lúmen intestinal (HERSCHEL *et al.*, 1981), por isso podem deixar as fezes mais consistentes. Por contribuir com a absorção de água, os AGCC, em sua grande maioria são totalmente absorvidos antes de chegar ao colon distal (VON ENGERLHARD, 1995). Assim, a mensuração destes ácidos graxos a partir das fezes de cães pode ser subestimada em relação aos valores reais (STROMPFOVÁ *et al.*, 2017). Talvez por este motivo, este estudo não apresentou diferença para nenhum dos AGCC mensurados. Corroborando com estes dados, Swanson *et al.* (2002) também não encontraram diferença nesta análise para cães alimentados com dietas contendo MOS.

Beloshapka *et al.* (2012) encontraram concentrações maiores de acetato e AGCC totais suplementando 1,4% de parede de levedura em cães. Estes resultados não se refletiram neste experimento talvez pelo nível inferior de inclusão do prebiótico. Além disso, o MOS é moderadamente fermentável no intestino, por isso, pode resultar em menor produção de AGCC em relação a outros prebióticos, como frutooligossacarídeos e inulina (VICKERS *et al.*, 2001).

Swanson *et al.* (2002) não encontraram diferença nas concentrações de fenóis e indóis em fezes de cães alimentados com 1 g de MOS. No caso deste estudo, não houve diferença de odor fecal, sendo esta característica diretamente influenciada pelos níveis de fenóis e indóis.

Os AGCR também podem resultar em fezes mais fétidas, pois são produzidos a partir da fermentação de aminoácidos ramificados no intestino. Entretanto, a inclusão de levedura autolisada não afetou a digestibilidade da proteína da dieta e também não alterou as concentrações de AGCR. Os mesmos resultados foram encontrados por Beloshapka *et al.* (2012) e Swanson *et al.* (2002) avaliando MOS na dieta para cães.

A análise de ácido siálico é utilizada para indicar agressão à mucosa intestinal, sendo que o seu aumento é indicativo de maior excreção de mucinas pelo intestino. A concentração de ácido siálico no intestino tende a ser maior quando há infecções bacterianas ou fragilidade osmótica no intestino (PIRGOZLIEV *et al.*, 2007). Neste estudo, a inclusão de 1%M e 1%C não alterou a produção de mucina no intestino dos cães. Provavelmente isso se deve ao fato dos cães não terem sido submetidos a nenhum desafio dietético, uma vez que consumiram uma dieta comercial padrão, sem agentes agressores à mucosa intestinal.

#### 4.2 EXPERIMENTO II: ENSAIO DE PALATABILIDADE

Os cães consumiram em maior quantidade a dieta 1%C em relação a dieta CO e para o teste entre as dietas CO e 1%M os cães consumiram em maior quantidade a dieta controle. A levedura de cana de açúcar pode promover sabor e intensificar os demais sabores pela presença de íons sódio. Além disso, apresenta glutamato e nucleotídeos (KURIHARA; KASHIWAYANAGI, 2000). Esta preferência pode estar associada a

presença de ácido glutâmico no extrato de levedura de cepa específica que torna a dieta mais palatável por sensibilizar os receptores *umami* (TESHIMA *et al.*, 2007).

Martins *et al.* (2014) também observaram aumento no consumo da dieta contendo levedura de cana de açúcar autolisada para cães. Por este motivo a dieta com inclusão em cobertura obteve maior consumo, além da primeira escolha ter sido maior para este tratamento também. O fato dos cães terem preferido a dieta CO, em relação à dieta com 1%M, pode ser um indício que o processo de extrusão altere as características sensoriais da levedura, sendo importante maior investigação sobre isso.

## **5 - CONCLUSÃO**

A inclusão de 1% de levedura autolisada adicionada em cobertura à dieta aumenta a palatabilidade de alimentos destinados a cães em relação à dieta controle. Entretanto, a inclusão tanto em massa quanto em cobertura não altera a digestibilidade, produtos de fermentação intestinal e odor fecal dos cães.

## REFERÊNCIAS

Association of American Feed Control Officials – AAFCO. Dog and cat nutrient profiles. **Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated**. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

Association of the Official Analytical Chemists - AOAC. **Official Methods of Analysis**, AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

ALVIM, I. D. **Efeito da extrusão termoplástica sobre propriedades funcionais e nutricionais de farinhas à base de milho, caseína e derivados de levedura**. 2001. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

BELOSHAPKA, A.N.; DUCLOS, L.M.; BOLER, B.M.V.; SWANSON, K.S. Effects of inulin or yeast cell wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentration, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. **American Journal of Veterinary Research**, v.73, n.7, p.1016-1023, 2012.

FELIX, A.P.; ZANATTA, C.P.; BRITO, C.B.M.; MURAKAMI, F.Y.; FRANÇA, M.I., MAIORKA, A.; FLEMMING, J.S. Suplementação mananoligossacarídeos (MOS), e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary Science**, v. 14, n.1, p. 31-35, 2009.

FÉLIX A.P.; ZANATTA C.P.; BRITO C.B.M.; SÁ FORTES C.M.L.; OLIVEIRA S.G.; MAIORKA A. Digestibility and metabolizable energy of raw soy manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **Journal of Animal Science**, v.91, p.2794-2801, 2013.

FLEMMING, J.S. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminossilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary science**, v.14, n.1, p.31-35, 2009.

HERSCHEL, D.A.; ARGENZIO, R.A.; SOUTHWORTH, M.; STEVENS, C.E. Absorption of volatile fatty acid, Na, and H<sub>2</sub>O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, n.42, p.1118–1124, 1981.

ICC. INDUSTRIAL COMÉRCIO EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO. HILYSES. Material promocional. São Paulo: ICC 2010.

KNORR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. Na enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, v.44, n.5, p.1362-1365, 1979.

KURIHARA, K.; KASHIWAYANAGI, M. Physiological studies on umami taste. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 931-934, 2000.



MARTINS, M.S.; SAKOMURA N.K.; SOUZA, D.F.; FILHO, F.O.R.; GOMES, M.O.S.; VASCONCELLOS, R.S.; CARCIOFI, A.C. Brewer's yeast sugarcane yeast as protein sources for dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.98, p.948-957, 2014.

MIDDELBOSS, I.S.; GODOY, M. R.; FASTINGER, N.D.; FARREY JR, G.C. A dose-response evaluation of spray dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3022- 3032, 2007b.

Nutrient Requirements of Dogs and Cats - NRC. **National Academies Press**, NRC, Washington, DC, USA, 2006.

PIRGOZLIEV, V.O.; ODUGUWA, T.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. Diets containing Escherichia coli-derived phytase on young chickens and turkeys: Effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Journal of Poultry Science** v.86, p.705–713, 2007.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K.E. The effects of mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205-211, 2000.

STRICKLING, J.A.; HARMON, D.L.; DAWSON, K.A.; GROSS, K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

STROMPFÓVÁ, V.; KUBASOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic Lactobacillus fermentum CCM 7421 application in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.010, n.16, p.6309-6319, 2017.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L.L.; HEALY, H.P.; DAWSON, K.A.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JR, G.C. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanoligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. **The Journal of Nutrition**, p. 980-988, 2002b.

TESHIMA, E.; RIVERA, N.L.M.; KAWAUCHI, I.M.; GOMES, M.O.S.; BRUNETTO, M.A.; CARCIOFI, A.C. Extrato de levedura na alimentação de cães: digestibilidade e palatabilidade. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Jaboticabal, 2007.

VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D.; KELLEY, R.L.; REINHART, G.A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.609-615, 2001.

VON ENGELHARD, W. Absorption of short-chain fatty acids from the large intestine. Physiological and clinical aspects of short-chain fatty acids. Cambridge University Press, p.149-170, 1995.

ZENTEK, J., MARQUART, B., PIETRZAK, T. Intestinal effects of mannanoligosaccharides, transgalactooligosaccharides, lactose and lactulose in dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1682S – 1684S, 2002.

### **CAPITULO III – Efeitos de *Bacillus subtilis* C-3102 sobre a digestibilidade da dieta, características fecais e microbiota de cães**

#### **RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de *Bacillus subtilis* C-3102 sobre a digestibilidade da dieta, características fecais e microbiota de cães. Dezesesseis cães Beagle adultos foram distribuídos aleatoriamente ( $n = 8$ ) para um dos dois tratamentos dietéticos por 33 dias: controle (sem probiótico) e probiótico (*B. subtilis* C-3102,  $1 \times 10^6$  UFC / g de dieta). Não houve diferença entre os coeficientes de digestibilidade aparente do trato total (CTTAD) e a energia metabolizável (EM) das dietas ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não houve diferenças para o pH fecal e ácido siálico ( $P > 0,05$ ). No entanto, maior escore fecal ( $P < 0,001$ ), conteúdo de matéria seca ( $P = 0,021$ ) e concentração de ácido propiônico ( $P = 0,039$ ) e menor odor fecal ( $P < 0,001$ ) e amônia ( $P = 0,037$ ) foram observados em cães alimentados com probiótico. O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou que a adição de *B. subtilis* alterou a microbiota intestinal de cães. Alterações proporcionais da microbiota intestinal entre os grupos foram detectadas em quatro filos principais e 13 gêneros de bactérias ( $P < 0,05$ ). A diversidade bacteriana do intestino foi maior ( $P = 0,021$ ) em cães alimentados com probiótico. Dessas mudanças, o interesse particular foi a maior abundância de *Faecalibacterium* em cães alimentados com probiótico, que é considerado como tendo efeitos benéficos sobre a saúde intestinal. No geral, os dados indicam que a inclusão de  $1 \times 10^6$  UFC / g de *B. subtilis* C-3102 na dieta tem efeitos probióticos para melhorar as características fecais e alterar a microbiota fecal de cães.

**Palavras-chave:** *Faecalibacterium*, Probiótico, Saúde animal.

## Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 on diet digestibility and faecal characteristics and microbiota of dogs

### ABSTRACT

This study aimed at evaluating the effects of *Bacillus subtilis* C-3102 on diet digestibility and faecal characteristics and microbiota of dogs. Sixteen adult Beagle dogs were randomly assigned (n=8) to one of the two dietary treatments for 33 days: control (no probiotic) and probiotic (*B. subtilis* C-3102,  $1 \times 10^6$  CFU/g diet). There was no difference between the coefficients of total tract apparent digestibility (CTTAD) and metabolisable energy (ME) of diets ( $P > 0.05$ ). Likewise, there were no differences for faecal pH and sialic acid ( $P > 0.05$ ). However, greater faecal score ( $P < 0.001$ ), dry matter content ( $P = 0.021$ ) and propionic acid concentration ( $P = 0.039$ ) and lower faecal odor ( $P < 0.001$ ) and ammonia ( $P = 0.037$ ) were observed in dogs fed with probiotic. The 16S rRNA gene sequencing revealed that the addition of *B. subtilis* altered gut microbiota of dogs. Proportional changes of gut microbiota between groups were detected in four major phyla and 13 genera of bacteria ( $P < 0.05$ ). Gut bacterial diversity was greater ( $P = 0.021$ ) in dogs fed probiotic. Of these changes, particular interest was the greater abundance of *Faecalibacterium* in dogs fed probiotic, which is considered to have beneficial effects on gut health. Overall, the data indicate that inclusion of  $1 \times 10^6$  CFU/g of *B. subtilis* C-3102 in diet has probiotic effects to improve faecal characteristics and alter faecal microbiota of dogs.

**Keywords:** Animal health, *Faecalibacterium*, Probiotic.

## 1- INTRODUCTION

To guarantee welfare and longevity of dogs, many functional additives have been used in commercial dog foods. These include probiotics, which may contribute to the intestinal health of dogs. Probiotics are composed of living microorganisms that once introduced into the animal organism beneficially affect the host by improving the intestinal microbial balance (FULLER, 1989). The use of probiotics may inhibit the growth of pathogenic microorganisms in the gut and thereby reduce the production of toxic compounds such as ammonia and biogenic amines (CAPELLI *et al.*, 2016). Thus, in addition to contributing to the animal health, it may potentially reduce faecal odor.

Among the probiotics used in the pet food industry, the use of bacteria of the genus *Bacillus* stands out. These bacteria present greater stability during food processing, storage and in the gastrointestinal system, since they are marketed in the spore form (BIOURGE *et al.*, 1998). *Bacillus subtilis* is one of the most popular probiotic species and its addition in the diet is considered to improve intestinal health of dogs by aiding in eubiosis, reducing the production of toxic compounds in the intestine and improving the faecal characteristics.

The objective of this study was to evaluate the faecal characteristics, nutrient and energy digestibility and faecal microbiota of dogs fed diets containing probiotic strain of *B. subtilis*.

## 2- MATERIALS AND METHODS

The experiment was approved by the Animal Ethics Committee of the Agrarian Sciences sector of the Federal University of Paraná, Curitiba-PR, Brazil (051/2016).

### 2.1 ANIMALS AND FACILITIES

The experiment was carried out with 16 adult Beagle dogs (eight males and eight females) of 1 year of age. Their average body weight was  $8.9 \pm 1.1$  kg. Dogs were individually housed in concrete kennels (2 m x 5 m). All dogs were submitted to clinical and physical examination and were vaccinated and de-wormed before the experiment.

## 2.2 EXPERIMENTAL DIETS

Two isonutritive extruded dry diets with the same formulation were prepared for adult dogs: one control (no probiotic) and one with inclusion of  $1 \times 10^6$  CFU/g of *B. subtilis* C-3102 (Table 1). *Bacillus subtilis* was mixed with poultry fat and sprayed on diet after extrusion. The basal diet had the following ingredients: chicken by-product meal, meat meal, maize, soybean meal, poultry fat, swine liver hydrolyzate, sodium chloride, citric acid, antioxidants (BHT, BHA), propionic acid, vitamin A, vitamin D3, vitamin E, vitamin B1, vitamin B6, vitamin B12, vitamin K3, nicotinic acid, folic acid, biotin, calcium pantothenate, zinc sulfate, calcium iodate, sodium selenite, copper sulfate, iron sulfate, manganese monoxide, manganese sulfate, and zinc oxide. Diets were offered twice a day (8:00 a.m. and 4:00 p.m.) in sufficient amount to meet the metabolizable energy requirements of each animal according to the NRC (2006). Water was provided *ad libitum*.

**Table 1** - CHEMICAL COMPOSITION OF EXPERIMENTAL DIETS BASED ON DRY MATTER.

%	Control	Probiotic
Dry matter	91,98	92,30
Crude protein	20,58	20,21
Ether extract in acid hydrolysis	10,34	10,85
Ashes	5,92	5,67
Crude fiber	1,75	1,50
Calcium	1,39	1,16
Phosphorus	0,79	0,73

## 2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

The digestibility assay was conducted by the total faecal collection method, considering the recommendations of the Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 2004). Diets were offered for an adaptation period of 28 days followed by five days of total faecal collection.

Faeces were collected and weighed twice daily and stored in individual identified plastic containers at  $-14^{\circ}$  C until analysis. At the end of the experiment, faeces were thawed, homogenized, and dried in a forced-ventilation oven at  $55^{\circ}$ C (320-SE, Fanem, São Paulo, Brazil) for 48 h or until they reached constant weight. Dried faeces and diets

were ground to 1-mm particles in a Willey hammer mill (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA) and analysed for dry matter (DM), crude protein (CP, method 954.01), crude fibre (CF, method 962.10), acid-hydrolysable ether extract (EE, method 954.02), and ash (method 942.05) according to the Association of the Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Gross energy (GE) was determined in an isoperibol bomb calorimeter (Parr Instrument Co., model 1261, Moline, IL).

According to AAFCO (2004), the coefficients of total tract apparent digestibility (CTTAD) of nutrients and energy and the metabolizable energy (ME) of the diets were calculated based on the laboratory results obtained:

$$\text{CTTAD} = (\text{g nutrient intake} - \text{g nutrient excreted}) / \text{g nutrient intake}$$

$$\text{ME (kcal g}^{-1}\text{)} = \{\text{kcal g}^{-1} \text{ GE intake} - \text{kcal g}^{-1} \text{ GE faecal excretion} - [(\text{g CP intake} - \text{g CP faecal excretion}) \times 1.25 \text{ kcal g}^{-1}]\} / \text{g of feed intake}$$

Faecal characteristics were evaluated at the end of the trial by analyzing dry matter content, faecal score, pH, ammonia concentration, odor, short chain fatty acids (SCFA), branched chain fatty acids (BCFA) and sialic acid contents. Faecal score was always evaluated by the same researcher and recorded every day for individual animals using a 1-5 scale: 1 = watery faeces; 2 = soft and unshaped faeces; 3 = soft, shaped, and moist faeces; 4 = well-shaped and uniform faeces; 5 = well-shaped, hard and dry faeces.

Faecal pH and ammonia concentration were analyzed in faeces collected within 15 minutes after defecation. Faecal pH was measured using a digital pH meter (331, Politec Instrumentos de Teste Ltda, São Paulo, SP, Brazil) using 3.0 g of fresh faeces diluted with 30 mL of distilled water. The concentration of ammonia in faeces was determined according to the method described by Félix *et al.* (2013).

For the evaluation of faecal odor, fresh faeces were sampled on the last day of study at 8:30 am. Faeces were collected from three randomly selected animals of each treatment. Samples were pooled per treatment, homogenized and stored in an equal amount (50 g) in a plastic container, which was covered with 36-hole film paper. Faecal odor was evaluated by 50 volunteers by comparing the odor of fresh faeces of the animals fed probiotic to those fed with control diet after inhaling the odor of a pot containing coffee. The scores meant: 1 = better odor (less fetid / less intense) than control, 2 = equal odor to control and 3 = worse odor (more fetid / more intense) than control.

For SCFA and BCFA determination, fresh faeces were collected within 15 minutes after defecation. In a properly labeled plastic container with a lid, 10 g of faecal sample were weighed and mixed with 30 mL of 16% formic acid. This mixture was homogenized and stored at 4 °C for a period of 3 to 5 days. Before the analysis, these solutions were centrifuged at 5000 rpm in a centrifuge (2K15, Sigma, Osterodeam Hans, Germany) for 15 minutes. At the end of the centrifugation, the supernatant was separated and subjected to further centrifugation. Each sample underwent three centrifugations and at the final supernatant was transferred to duly identified microtubes for further freezing. Subsequently, the samples were thawed and centrifuged again at 14,000 rpm for 15 minutes (Rotanta 460 Robotic, Hettich, Tuttlingen, Germany). Fecal SCFA and BCFA were analyzed by gas chromatography (SHIMADZU, model GC-2014, Kyoto, Japan) by using a glass column (Agilent Technologies, HP INNO wax-19091N, Santa Clara, USA) of 30 m long and 0.32 mm wide. Nitrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 3.18 ml/min. Working temperatures were 200°C in the injection, 240°C in the column (at the rate of 20° C / min) and 250° C in the flame ionization detector.

For analysis of sialic acid, faeces were dried in lyophilizer (Alpha 1-4 LO plus, Christ, Osterodeam Hans, Germany) and the analysis was done according to the method described by Jourdian et al. (1971).

Faecal microbiota was evaluated at the end of the trial by sequencing the 16S rRNA gene. Fresh faeces were collected immediately after defecation with sterile gloves. There was no contact with the soil. Approximately 2 g of each sample was placed in individual sterile pots.

The samples were stored in a freezer at -80°C until analysis. Zymo Research's "ZR Fecal DNA MiniPrep®" commercial kit was used to extract the DNA from the samples following the protocol recommended by the manufacturer. The extracted DNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm using the NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). To evaluate the integrity of the extracted DNA, all samples were run by 1% agarose gel electrophoresis, stained with 1% ethidium bromide solution and visualized with ultraviolet light in ultraviolet light transilluminator.

A 250-base segment of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified using the 515F and 806R universal primers and the following PCR conditions:



94°C for 3 min; 18 cycles of 94°C for 45 sec, 50°C for 30 sec and 68°C for 60 sec; followed by 72°C for 10 min. From these amplifiers, the metagenomic library was constructed using the commercial kit "Nextera DNA Library Preparation Kit" from Illumina®. Subsequently, the library containing clones identified with barcodes specific for each sample was sequenced on the Illumina® "MiSeq" sequencer (DEGNAN and OCHMAN, 2012). The readings obtained from the sequencer were analyzed on the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) platform (CAPORASO *et al.*, 2010; CAPORASO *et al.*, 2011), followed by a workflow of the removal of sequences from low quality, filtration, removal of chimeras and taxonomic classification. To normalize the data among samples, 12804 readings per sample were used for further analysis. The readings were randomly sampled from the original pool of readings by using NumPy, a package for scientific computing in Python. Sequences were classified into bacterial groups at different levels (phyla to genera) through the recognition of operative taxonomic units (OTUs) according to the homology of obtained sequences and those in the database. To compare the sequences, the last update (SILVA 128) of the year 2017 of the database of ribosomal sequences SILVA was used (YILMAZ *et al.*, 2013).

## 2.4 EXPERIMENTAL DESIGN AND STATISTICAL ANALYSIS

The experiment was analyzed according to a completely randomized design in which eight dogs received the control diet and eight received the diet containing *B. subtilis*. Data were first analyzed for normality by the Shapiro-Wilk test and the homoscedasticity of variance by Bartlett test. When these assumptions were met, data were analyzed by Student's t-test with Bonferroni correction with a confidence level of 95%. Data of faecal score, ammonia and odor did not present normal distribution, therefore were analyzed by Kruskal Wallis test with a confidence level of 95%, and medians were presented instead of means.

In the microbiota analysis, the data obtained in QIIME were analysed by the STAMP metagenomic statistical program: statistical analysis of taxonomic and functional profiles (PARKS *et al.*, 2014). One sample from *B. subtilis* group was removed as an outlier from further analysis due to an abnormally high number of OTUs detected from

this sample. To compare the abundance of different bacterial groups between treatments, data were analysed by the Welch t-test with a confidence level of 95%. Principal component analysis (PCA) was performed based on the Bray-Curtis distance matrix of the genus-level bacterial abundance. Data on community richness were analysed by comparing the number of OTUs in each treatment group using the Student's t-test with a confidence level of 95%.

### 3 - RESULTS

The inclusion of *B. subtilis* in extruded dog diet did not have effects ( $P > 0.05$ ) on the CTTAD and ME of the diets (Table 2).

**Table 2** - MEANS OF COEFFICIENTS OF TOTAL TRACT APPARENT DIGESTIBILITY (CTTAD, %), METABOLIZABLE ENERGY (ME, KCAL/KG) AND INTESTINAL FERMENTATIVE END-PRODUCTS OF DOGS FED WITH CONTROL AND PROBIOTIC DIET.

Item	Control	Probiotic	SEM	P
CTTAD				
Dry matter	74.2	73.7	0.51	0.621
Organic matter	80.2	79.6	0.39	0.478
Crude protein	73.3	72.5	0.67	0.547
Ether extract	82.9	82.4	0.54	0.086
ME	3705.3	3661.4	22.01	0.339
Faecal characteristics				
Dry matter (%)	30.26	33.85	0.23	0.021
pH	6.83	6.96	0.07	0.392
Sialic acid*	3.17	3.71	0.16	0.274
SCFA**				
Acetic	25.66	26.65	0.78	0.547
Propionic	12.21	14.14	0.48	0.039
Butyric	3.88	3.87	0.26	0.982
Total SCFA	41.75	44.66	1.39	0.311
BCFA***				
Isobutyric	0.55	0.57	0.02	0.832
Isovaleric	0.66	0.71	0.03	0.327
Valeric	0.16	0.15	0.02	0.686
Total BCFA	1.41	1.42	0.07	0.660

SEM: standard error of the mean, P: probability, \*  $\mu\text{mol/g}$  sample, \*\* short-chain fatty acids ( $\mu\text{mol/g}$  of dry matter), \*\*\* branched chain fatty acids ( $\mu\text{mol/g}$  of dry matter).

For faecal characteristics, there was no difference in pH and sialic acid ( $P > 0.05$ ) between treatments, but dogs fed *B. subtilis* had greater faecal dry matter content ( $P <$

0.05) compared to control dogs. For SCFA and BCFA, greater faecal concentration of propionic acid ( $P < 0.05$ ) was observed for dogs fed the probiotic. Dogs fed *B. subtilis* had lower concentrations of faecal ammonia and milder faecal odor than those fed the control diet ( $P < 0.05$ , Table 3).

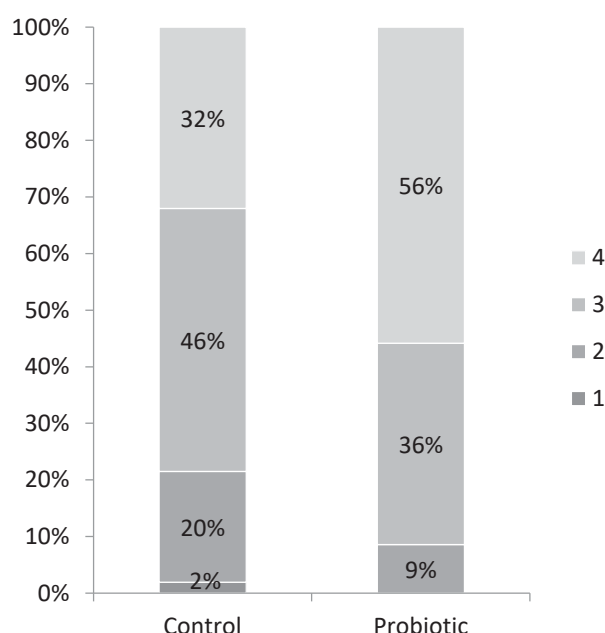
**Table 3** - MEDIAN FECAL SCORE, AMMONIA, AND FAECAL ODOR OF DOGS FED CONTROL AND PROBIOTIC DIETS.

Item	Control	Probiotic	P
Score*	3	4	<0.001
Ammonia**	0.07	0.06	0.037
Odor***	2	1	<0.001

P: probability, DM: dry matter, \*score: 1 = watery faeces to 5 = well-shaped, hard and dry faeces, \*\*ammonia (%), \*\*\*odor: 1 = better than control; 2 = equal to the control; 3 = worse than control

Overall faecal score was greater in dogs fed probiotic ( $P < 0.05$ ), which is consistent with the higher faecal dry matter content observed in this group. Distribution of faecal scores over the study period is shown in Figure 1. No dog showed faecal score of 5 (well-shaped, hard and dry). The most frequent score in the control dogs was 3 (soft, shaped and moist) whereas that in the dogs fed probiotic was 4 (well-shaped and uniform). The faecal scores lower than 2 (soft and unshaped) were observed in 21.5% of control dogs and 8.6% of dogs fed probiotic.

FIGURE 1 - DISTRIBUTION OF FAECAL SCORES DURING THE STUDY (1 = WATERY FAECES TO 5 = WELL-SHAPED, HARD AND DRY FAECES).



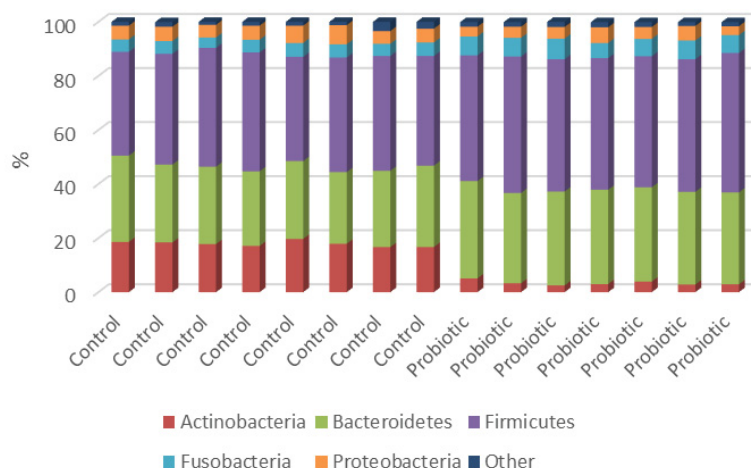
The mean distribution of bacterial phylum sequence is shown in Table 4 and individually per dog in Figure 2. Significant differences between treatments were observed in the relative abundance of Firmicutes (control 41.44%, probiotic 49.13%;  $P < 0.001$ ); Bacteroidetes (control 28.81%, probiotic 34.60%;  $P < 0.001$ ); Actinobacteria (control 17.86%, probiotic 3.36%;  $P = 0.040$ ), and Fusobacteria (control 4.66%, probiotic 6.71%;  $P < 0.001$ ).

**Table 4** - MEAN AND STANDARD DEVIATION (SD) OF THE MAIN PHYLUM FOUND IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.

Phylum	Control Mean (%)	Control SD	Probiotic Mean (%)	Probiotic SD	P
Firmicutes	41.44	2.183	49.13	1.607	<0.001
Bacteroidetes	28.81	1.623	34.60	0.821	<0.001
Actinobacteria	17.86	1.035	3.36	0.887	0.040
Proteobacteria	5.45	0.852	4.41	0.904	0.842
Fusobacteria	4.66	0.403	6.71	0.618	<0.001

$P < 0.05$  by Student's t-test after Bonferroni correction

FIGURE 2 - INDIVIDUAL DISTRIBUTION OF THE MAIN PHYLUM FOUND IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.



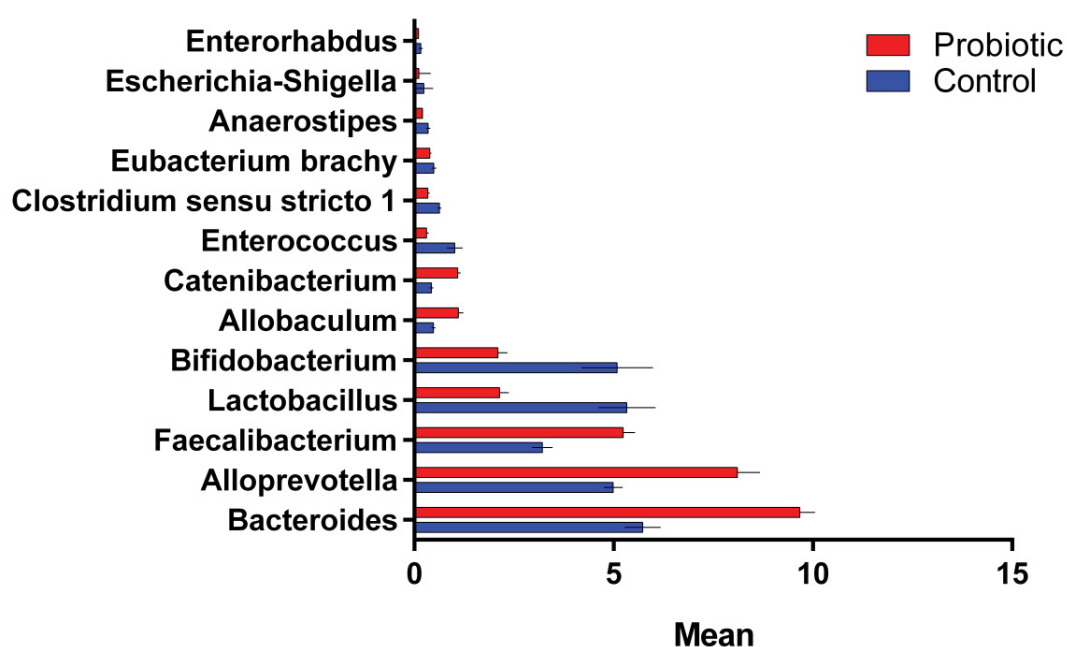
At the genus level, 168 bacterial genera were identified in total. Of these, 13 genera presented a significant difference ( $P < 0.05$ ) in their abundance between treatments (Table 5 and Figure 3). In the control group, a significantly greater abundance was observed in eight bacterial groups: *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Lactobacillus*, *Anaerostipes*, *Escherichia-Shigella*, *Enterorhabdus*, and *Eubacterium brachy*. In the group fed *B. subtilis*, a significantly greater abundance was observed in five groups: *Bacteroides*, *Alloprevotella*, *Faecalibacterium*, *Allobaculum*, and *Catenibacterium*.

**Table 5** - MEAN AND STANDARD DEVIATION (SD) OF THE ABUNDANCE OF THE BACTERIAL GENERA STATISTICALLY DIFFERENT IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.

Genera	Control Mean (%)	Control SD	Probiotic Mean (%)	Probiotic SD	P*
<i>Bacteroides</i>	5.725	0.453	9.671	0.359	<0.001
<i>Alloprevotella</i>	4.988	0.242	8.100	0.537	<0.001
<i>Faecalibacterium</i>	3.213	0.259	5.243	0.281	<0.001
<i>Lactobacillus</i>	5.325	0.723	2.143	0.213	<0.001
<i>Bifidobacterium</i>	5.088	0.898	2.100	0.227	<0.001
<i>Allobaculum</i>	0.475	0.046	1.100	0.125	<0.001
<i>Catenibacterium</i>	0.425	0.046	1.086	0.064	<0.001
<i>Enterococcus</i>	1.013	0.196	0.300	0.053	<0.001
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	0.625	0.046	0.343	0.053	<0.001
<i>Eubacterium brachy</i>	0.488	0.064	0.386	0.035	0.005
<i>Anaerostipes</i>	0.350	0.053	0.200	0.000	<0.001
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.238	0.233	0.114	0.283	0.001
<i>Enterorhabdus</i>	0.163	0.052	0.100	0.000	0.005

P < 0.05 by Student's t-test after Bonferroni correction

FIGURE 3 - MEAN AND STANDARD DEVIATION OF THE ABUNDANCE OF THE BACTERIAL GENERA STATISTICALLY DIFFERENT ( $P < 0.05$ ) IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.



A clear differentiation of the bacterial communities between treatments was observed by PCA (Figure 4). Regarding the richness of bacterial community, significantly greater number of OTUs was observed in faeces of dogs fed the diet containing *B. subtilis* ( $P < 0.05$ , Figure 5).

FIGURE 4 - PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN FECES OF DOGS FED DIETS WITH OR WITHOUT PROBIOTIC.

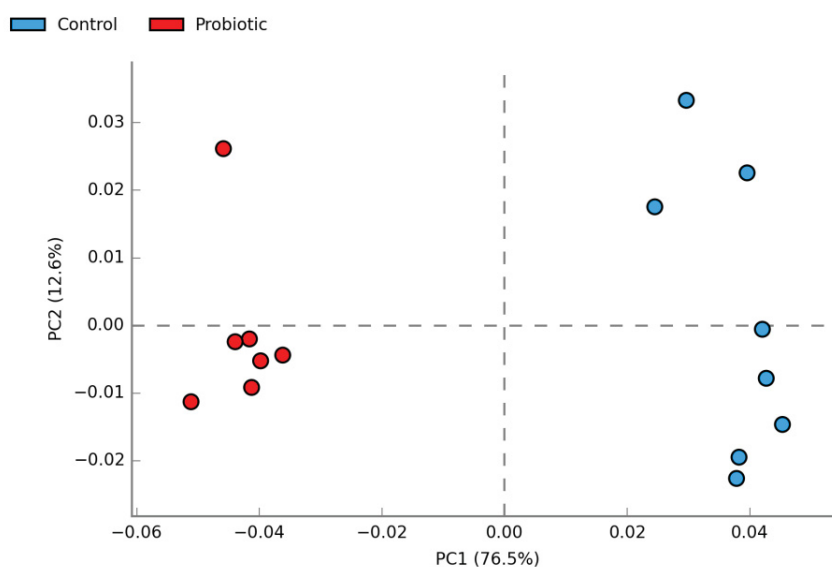
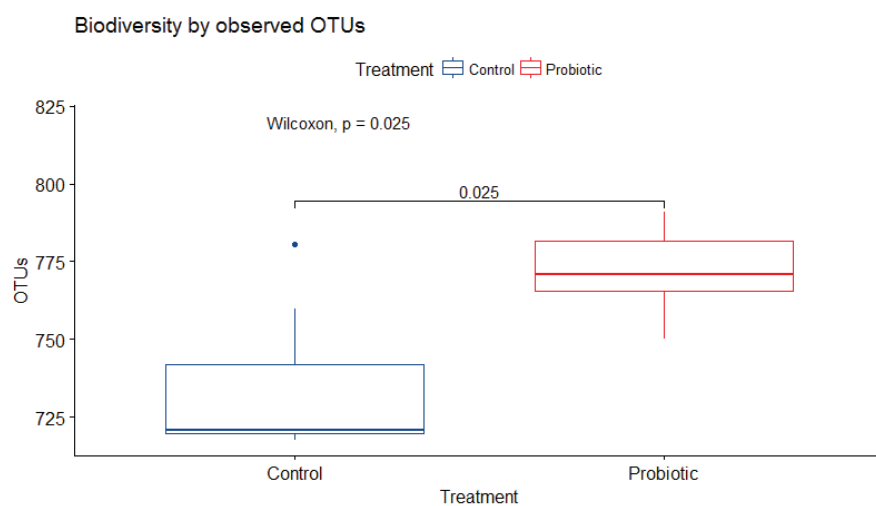


FIGURE 5 - RICHNESS OF BACTERIAL COMMUNITIES (NUMBER OF OTUS PER 12804 READINGS) OF FECES OF DOGS FED CONTROL OR PROBIOTIC DIETS (P = 0.021).



## 4 - DISCUSSION

The inclusion of  $1 \times 10^6$  CFU/g of *B. subtilis* did not alter the CTTAD and ME of the diets. These data are consistent with those presented by Félix *et al.* (2010) and González-

Ortiz *et al.* (2013), who also did not find differences for the digestibility of diets containing *B. subtilis* or *Bacillus amyliquefaciens* and *Enterococcus faecium* in dogs. *Bacillus subtilis* C-3102 has previously been shown to improve digestibility of dry matter and gross energy in poultry (Jeong and Kim, 2014). However, González-Ortiz *et al.* (2013) suggests that, although improved digestibility is desired in livestock, it would not be so interesting in pet food considering the high prevalence of obesity or overweight in pet dogs.

Faecal pH of dogs supplemented with *B. subtilis* was not affected in the present study, also in agreement with the studies by Félix *et al.* (2010) and González-Ortiz *et al.* (2013).

In SCFA measurement, the increase was only observed for propionic acid. The SCFA, which are produced from the intestinal fermentation of carbohydrates, tend to be absorbed rapidly into the intestinal lumen, and most of them are fully absorbed before reaching the distal colon (VON ENGERLHARD, 1995). For this reason, the measurement of SCFA from faeces can underestimate the real values (STROMPFOVÁ *et al.*, 2017). It is possible that the analysis performed in the present study overlooked changes of other SCFA in the intestine. Propionic acid has some distinct health-promoting properties such as reducing lipogenesis and stimulating satiety, with strong effects towards weight control and feeding behavior (HOSSEINI *et al.*, 2011). Although we did not detect any difference in feeding behavior in this study, the increase of propionic acid observed in the probiotic group may potentially contribute to better weight control of obese or overweight dogs.

The increase of faecal consistency and DM in dogs fed *B. subtilis* is consistent with studies by Félix *et al.* (2010) and Paap *et al.* (2016), which evaluated the same probiotic strain *B. subtilis* C-3102. The observation may be related to the greater production of intestinal propionic acid or total SCFA. The SCFAs, being readily absorbed by the intestinal mucosa, contribute to water absorption. The production of SCFA is directly related to osmoregulation of the intestine. Thus, it increases the rate of sodium uptake, responsible for most of the water absorbed in the intestinal lumen (HERSCHEL *et al.*, 1981).

The analysis of sialic acid was used to evaluate intestinal mucosal health, as it can be an indicator of mucin loss in the intestine. The concentration of sialic acid in the intestine tends to be higher when there are bacterial infections or osmotic fragility in the



intestine (PIRGOZLIEV *et al.*, 2007). In the present study, *B. subtilis* supplementation did not alter the sialic acid level in the faeces of dogs. This is probably because the dogs were consuming a standard commercial diet and were not subjected to any dietary challenge which affects the intestinal mucosa.

Ammonia concentration was lower in faeces of dogs supplemented with *B. subtilis*. Their faeces were also considered less fetid compared to the faeces of dogs fed the control diet, indicating that lower ammonia concentration may be related to the faecal odor. Félix *et al.* (2010) also reported similar data to the present study in relation to ammonia levels in their study with *B. subtilis* in dogs, but they did not investigate faecal odor. The inclusion of *B. subtilis* may have altered the microbiota in such a way that some microorganisms responsible to produce putrefactive compounds (biogenic amines, phenols, ammonia) are reduced. This is the case of *Clostridium perfringes*, which can metabolize nitrogen compounds (LIN and VISEK, 1991). In this study, a larger population of the genus *Clostridium* was found in the faeces of dogs fed control diet compared to those fed probiotic.

In this study, Firmicutes, Bacteroidetes and Actinobacteria were the three predominant bacterial phyla found in dog faeces. Schmitz and Suchodolski (2016) summarized multiple studies and reported that the predominant phyla in the dog gut microbiota would be *Fusobacteria* (24-40%), *Bacteroidetes* (32-34%), *Firmicutes* (15-28%), *Proteobacteria* (5-6%) and *Actinobacteria* (0.8-1.4%). Compared with these, the abundance of Actinobacteria (3.36-17.86%) was much higher in our study, and the majority of this phylum was consisted of the genus *Bifidobacterium*.

The most remarkable difference in the faecal microbiota between treatments was observed in the abundance of *Bifidobacterium*. In dogs fed probiotics, *Bifidobacterium* was significantly less represented in the microbiota, and other bacterial groups were enriched, especially those in the phylum Bacteroidetes and the genera *Bacteroides*, *Alloprevotella*, *Faecalibacterium*, and *Allobaculum*. Bacterial diversity was significantly higher in dogs fed probiotic as well.

Bacteroidetes is considered as the largest propionate producers in the human gut (RIOS-COVIAN *et al.*, 2017). It is possible that the higher abundance of *Bacteroides* in dogs fed *B. subtilis* contributed to the increase of faecal propionate. The increase of

*Faecalibacterium* in the group fed *B. subtilis* is particularly interesting. It has been reported that this genus comprises approximately 5% of dog faecal microbiota (GARCIA-MAZCORRO *et al.*, 2012), which is consistent with our observation in this study. This genus is recognized as a producer of butyrate, an important energy source for colonocytes (BJERRUM *et al.*, 2006). *Faecalibacterium prausnitzii*, the only known species of this genus, exhibits anti-inflammatory effects by secreting metabolites which block the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and the consequent production of the pro-inflammatory cytokine interleukin-8 (SOKOL *et al.*, 2008). Low abundance of *F. prausnitzii* has been linked to dysbiosis in several human disorders (MIQUEL *et al.*, 2013). Reduction of this genus was also observed in dogs with gastrointestinal diseases (SUCHODOSKI *et al.*, 2012; MINAMOTO *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2014) and its abundance seems to be an important indicator of the intestinal health of dogs (HONNEFFER *et al.*, 2014). Higher abundance of *Allobaculum* in the dogs fed probiotic may also be related to gut health, as this genus is reported to be lower in dogs with gastrointestinal diseases (MINAMOTO *et al.*, 2015).

Significantly lower abundance of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* was observed in the probiotic group. Lower proportional abundance of *Bifidobacterium* in probiotic group may partially be explained by higher bacterial diversity compared to the control group. Although *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are popular as lactic acid-producing probiotic bacteria, their efficacy in dogs is still not clearly demonstrated and it is not known if increased abundance of these bacterial groups is related to better gut health of dogs (SCHMITZ and SCHODOLSKI, 2016). In fact, Minamoto *et al.* (2014) reported higher number of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* in diseased dogs compared to healthy dogs. In our study, lower abundance of these bacteria in dogs fed probiotic did not seem to have any negative effects on their health.

Bacterial diversity is an important factor in stabilizing the gut microbiota and making it less susceptible to gut disorders. Reduced bacterial diversity has been reported in inflammatory bowel diseases of humans (OTT *et al.*, 2004, MANICHANH *et al.*, 2006, SOKOL *et al.*, 2008) and dogs (XENOULIS *et al.*, 2008). In this study, the greater bacterial diversity in dogs with probiotic may indicate better gut microbial stability compared to control dogs.

## 5 - CONCLUSIONS

The inclusion of  $1 \times 10^6$  CFU/g diet of *B. subtilis* C-3102 in extruded dog diets did not alter diet digestibility, but increased faecal propionic acid concentration, reduced faecal ammonia concentration, and improved faecal consistency and faecal odor. It also altered gut microbiota of dogs by increasing bacterial diversity and making proportional changes in major bacterial phyla and genera. The changes observed in the faecal characteristics and the microbiota are considered as beneficial for gut health. It is concluded that the use of *B. subtilis* C-3102 as a probiotic in dog food may be an effective way to support health and welfare of dogs.

## REFERENCES

Association of American Feed Control Officials – AAFCO. Dog and cat nutrient profiles. **Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated**. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

Association of the Official Analytical Chemists - AOAC. **Official Methods of Analysis**, AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B.; FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v.85 n.7, p.1151-1164, 2006.

CAPELLI, S., MANICA, E., HASHIMOTO, J.H. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos. **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 3, p. 212-223, 2016.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.108, n.1, p.4516-4522, 2011.

DEGNAN, P.H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, v.6 n.1, p.183-194, 2012.

FÉLIX, A.P.; TEIXEIRA NETTO, M. V.; MURAKAMI, F. Y.; BRITO, C. B. M.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and fecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. **Ciência Rural**, v.40, n. 10, p. 2169-2173, 2010.

FÉLIX, A.P.; ZANATTA, C.P.; BRITO, C.B.M.; SÁ FORTES, C.M.L.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and metabolizable energy of raw soya manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **Journal of Animal Science**, v.91 p.2794-2801, 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; DOWD, S.E.; POULSEN, J.; STEINER, J.M.; SUCHOODOLSKI, J.S. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **Microbiology Open**, v.1, p.340-347, 2012.

GONZÁLES-ORTIZ, G.; CASTILLEJOS, L.; MALLO, J.J.; CALVO-TORRAS, M.A.; BAUCCELLS, M.D. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT

5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 406-415, 2013.

HERSCHEL D; ARGENZIO R; SOUTHWORTH M; STEVENS C. Absorption of volatile fatty acids, Na, and H<sub>2</sub>O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.42 p.1118–1124, 1981.

HONNEFFER, J.B.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOSKI, J. S. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, p.16489-16497, 2014.

HOSSEINI, E. ; GROOTAERT, C. ; VERSTRAETE, W. ; VAN De WIELE, T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews** v.69, p.245-258, 2011.

JEONG, J.S.; KIM, I.H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, v.93 n.12, p.3097-103, 2014.

LIN, H.C.; VISEK, W.J. Large intestinal pH and ammonia in rats: dietary fat and protein interactions. **Journal of Nutrition**, v.121, p.832-843, 1991.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER, E., FRANGEUL, L.; NALIN, R. JARRIN, C.; CHARDON, C.; MARTEAU, P.; ROCA, J., DORE, J. Inflammatory bowel disease Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, p.205-211, 2006.

MIDDELBOS, I.S; BOLER, B.M.V.; QU, A.; WHITE, B.A.; SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *Plos One*, v.5, n.3, p.9768, 2010.

MINAMOTO, Y. ; DHANANI, N. ; MARKEL, M.E. ; STEINER, J.M. ; SUCHODOLSKI, J.S. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.174, p.463-473, 2014.

MINAMOTO, Y. ; OTONI, C.C. ; STEELMAN, S.M. ; BUYUKLEBLEBICI, O. ; STEINER, J.M. ; JERGENS, A.E. ; SUCHODOLSKI, J.S. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v.6, p.33–47, 2015.

MIQUEL, S.; MARTÍN, R.; ROSSI, O.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G. ; CHATEL, J.M.; SOKOL, H. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, v.16 n.3, p.255-261, 2013.

Nutrient Requirements of Dogs and Cats - NRC. **National Academies Press**, NRC, Washington, DC, USA, 2006.

OTT, S.J.; MUSFELDT, M.; WENDEROTH, D.F.; HAMPE, J.; BRANT, O.; FOLSCH, U.R.; TIMMIS, K.N.; SCHREIBER, S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, v.53, p.685-693, 2004.

PAAP, P.M; VAN DER LAAK, J.H.; SMIT, J.I; NAKAMURA, N.; BEYNEN, A.C. Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve feces consistency in dogs with chronic diarrhea. **Research opinions in animal and veterinary sciences**, v.6, p.8, p.256-260, 2016.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; AND BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v.30, n.21, p.123-3124, 2014.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. Diets containing *Escherichia coli*-derived phytase on young chickens and turkeys: Effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Journal of Poultry Science**, v.86, p.705–713, 2007.

RIOS-COVIAN, D.; SALAZAR, N.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILAN, C.G. Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.376, 2017.

ROSSI, G.; PENGU, G.; CALDIN, M.; PALUMBO, P.A.; STEINER, J.M.; COHEN, N.D.; JERGENS, A.E.; SUCHODOLSKI, J.S. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Plos One**, v.9 n.4, p.94699, 2014.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v.2, p.71-94, 2016.

## Capítulo IV - Referências Bibliográficas

ALVIM, I. D. **Efeito da extrusão termoplástica sobre propriedades funcionais e nutricionais de farinhas à base de milho, caseína e derivados de levedura**. 2001. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

ASSIS, E. M. Componentes da parede celular de leveduras: proteínas e polissacarídeos de interesse das indústrias farmacêuticas e de alimentos. WORKSHOP PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, 1996, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: ITAL, 1996, p. 41-51.

Association of American Feed Control Officials – AAFCO. Dog and cat nutrient profiles. **Official Publications of the Association of American Feed Control Officials Incorporated**. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

Association of the Official Analytical Chemists - AOAC. **Official Methods of Analysis**, AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

BATTISTI, J.A. Composição química e valores energéticos de alguns alimentos para suínos com diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.14, p.141-150, 1985.

BEASLEY, S.S.; MANNINEN, T.J.K.; SARIS, P.E.J. Lactic acid bacteria isolated from canine faeces, J. **Advances in Applied Microbiology**, v. 101, p. 131e138, 2006.

Benno Y.; Nakao H.; Uchida K.; Mitsuoka T. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, p. 703-706, 1992.

BELOSHAPKA, A.N.; DUCLOS, L.M.; BOLER, B.M.V.; SWANSON, K.S. Effects of inulin or yeast cell wall extract on nutrient digestibility, fecal fermentative end-product concentration, and blood metabolite concentrations in adult dogs fed raw meat-based diets. **American Journal of Veterinary Research**, v.73, n.7, p.1016-1023, 2012.

Biourge V.; Vallet C.; Levesque A.; Sergheraert R.; Chevalier S.; Robertson JL. 1998. The use of probiotics in the diet of dogs. **The Journal of Nutrition**, v.128, p.2730-2732, 1998. CAMPOS NETO, O. Utilização dos subprodutos da indústria sucroalcooleira na alimentação animal. SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO ANIMAL, 1987, Brasília, DF. **Anais...**1987, p.129-152.

BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B., FINSTER, K.; PEDERSEN, K. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poultry Science**, v.85 n.7, p.1151-1164, 2006.



BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, n.1, p.33-41, 1999.

CAPELLI, S., MANICA, E., HASHIMOTO, J.H. Importância dos aditivos na alimentação de cães e gatos. **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, n. 3, p. 212-223, 2016.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v.7, n.5, p.335-336, 2010.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v.108, n.1, p.4516-4522, 2011.

COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e Resposta Imune. **Ciência Rural**, RS, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CRITTENDEN R.; PLAYNE M.J.; Prebiotics. In: Lee YK, Salminen S. Handbook of Prebiotics and Probiotics 2th ed. New Jersey: John Wiley & Sons p.535-581, 2009.

DEGNAN, P.H.; OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, v.6 n.1, p.183-194, 2012.

DENG, P.; SWANSON, K.S. Gut microbiota of humans, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p.6-17, 2015.

EL KHOURY, D.; CUDA, CA.; LUHOVYY, B.L.; ANDEERSON, G.H. Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p. 1-28, 2012.

FAHEY, G.C.; MERCHEN, N.R.; CORBIN, J.E.; HAMILTON, A.K.; SERBE, K.A.; LEWIS, S.M.; HIRAKAWA, D.A. Levels of dietary beet pulp on nutrient intake. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4221–4228, 1990b.

FAHEY JUNIOR, G. C.; BARRY, K. A.; SWANSON, K. S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. **The Annual Review of Nutrition**, v. 28, p. 425-445, 2008.

FARNWORTH, E.R.; MODLER, H.W.; JONES, J.D.; CAVE, N.; YAMAZAKI, H.; RAO, A.V. Feeding Jerusalem artichoke flour rich in fructooligosaccharides to weanling pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v.72, n.12, p.977-980, 1992.

FELIX, A.P.; ZANATTA, C.P.; BRITO, C.B.M.; MURAKAMI, F.Y.; FRANÇA, M.I., MAIORKA, A.; FLEMMING, J.S. Suplementação mananoligossacarídeos (MOS), e uma



mistura de aluminosilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary Science**, v. 14, n.1, p. 31-35, 2009.

FÉLIX, A.P.; TEIXEIRA NETTO, M. V.; MURAKAMI, F. Y.; BRITO, C. B. M.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and fecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. **Ciência Rural**, v.40, n. 10, p. 2169-2173, 2010.

FÉLIX, A.P.; ZANATTA, C.P.; BRITO, C.B.M.; SÁ FORTES, C.M.L.; OLIVEIRA, S.G.; MAIORKA, A. Digestibility and metabolizable energy of raw soya manufactured with different processing treatments and fed to adult dogs and puppies. **Journal of Animal Science**, v.91 p.2794-2801, 2013.

FERNANDES, P.C.C.; SILVA, A.V.; RODRIGUEZ, N.M.; FERREIRA, C.L.L.F.; Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães. **Disponível em:** <http://www.vetnil.com.br/idiomas/wp-content/uploads/2012/05/viabilidade.pdf>. Acesso em: 22/01/2019.

FLEMMING, J.S. Suplementação de mananoligossacarídeos (MOS) e uma mistura de aluminosilicatos na qualidade das fezes de cães adultos. **Archives of veterinary science**, v.14, n.1, p.31-35, 2009.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-442, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GARCIA-MAZCORRO, J.F.; DOWD, S.E.; POULSEN, J.; STEINER, J.M.; SUCHOODOLSKI, J.S. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. **Microbiology Open**, v.1, p.340-347, 2012.

GONZÁLES-ORTIZ, G.; CASTILLEJOS, L.; MALLO, J.J.; CALVO-TORRAS, M.A.; BAUCCELLS, M.D. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 406-415, 2013.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GONZÁLES-ORTIZ, G.; CASTILLEJOS, L.; MALLO, J.J.; CALVO-TORRAS, M.A.; BAUCCELLS, M.D. Effects of dietary supplementation of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 and *Enterococcus faecium* CECT 4515 in adult healthy dogs. **Archives of Animal Nutrition**, v.67, n.5, p.406-415, 2013.

GRZESKOWIAK, L.; ENDO, A.; BEASLEY, S.; SALMINEN, S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. **Anaerobe**, v.34, p. 14-23, 2015.

HAND, D.; WALLIS, C.; COLYER, A.; PENN, C.W. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. **PLoS One** 8, ed.53115, 2013.

HENDRIKS, W.H.; VAN BAAL, J.; BOSCH, G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species viem. **The British Journal of Nutrition**, v.108, n.S2, p.247-257, 2012.

HERSCHEL D; ARGENZIO R; SOUTHWORTH M; STEVENS C. Absorption of volatile fatty acids, Na, and H<sub>2</sub>O by the colon of the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.42 p.1118–1124, 1981.

HONNEFFER, J.B.; MINAMOTO, Y.; SUCHODOSKI, J. S. Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. **Wold Journal of Gastroenterology**, v.20, p.16489-16497, 2014.

HOSSEINI, E. ; GROOTAERT, C. ; VERSTRAETE, W. ; VAN De WIELE, T. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews** v.69, p.245-258, 2011.

HUSSEIN, S.H. *et al.* Petfood Applications of Inulin and Oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1454-1456, 1999.

ICC. INDUSTRIAL COMÉRCIO EXPORTAÇÃO E IMPORTAÇÃO. HILYSES. Material promocional. São Paulo: ICC 2010.

JAEHRING. S.C., ROHN, S., KROH L.W., WILDENAUER, F.X., LISDAT, F., FLEISCHER, L.G., KURZ, T. Antioxidative activity of (1;3), (1;6)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. **Food Science and Technology**, Davis, v. 41, n. 5, p. 877, 2008.

JEONG, J.S.; KIM, I.H. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. **Poultry Science**, v.93 n.12, p.3097-103, 2014.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Biosciences**, v.27, p.703-714, 2002.

KNORR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F.; KINSELLA, J.E. Na enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, v.44, n.5, p.1362-1365, 1979.

KOZASA, M. Probiotics for animal use in Japan. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties, v.8, n.2, p.517-531, 1989.

KURDI, P.; KAWANISHI, K.; MIZUTANI, K.; YOKOTA, A. Mechanism of Growth Inhibition by Free Bile Acids in *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1979–1986, 2006.

KURIHARA, K.; KASHIWAYANAGI, M. Physiological studies on umami taste. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 931-934, 2000.

LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics grow promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 2, p. 103–107, 2007.

LIN, H.C.; VISEK, W.J. Large intestinal pH and ammonia in rats: dietary fat and protein interactions. **Journal of Nutrition**, v.121, p.832-843, 1991.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER-GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER, E., FRANGEUL, L.; NALIN, R. JARRIN, C.; CHARDON, C.; MARTEAU, P.; ROCA, J., DORE, J. Inflammatory bowel disease Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, p.205-211, 2006.

MANTOVANI, M.S.; BELLINI, M.F.; ANGELI, J.P.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.F.; RIBEIRO, L.R. Beta Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research**, v.658, n.3, p.154-161, 2008.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004.**

MARTINS, M.S.; SAKOMURA N.K.; SOUZA, D.F.; FILHO, F.O.R.; GOMES, M.O.S.; VASCONCELLOS, R.S.; CARCIOFI, A.C. Brewer's yeast sugarcane yeast as protein souces for dogs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.98, p.948-957, 2014.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JUNIOR, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v.343, n.5, p.338-344, 2000.

MIDDELBOSS, I.S.; GODOY, M. R.; FASTINGER, N. D.; FARREY JR, G. C. A dose-response evaluation of spray dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices and fecal microbial populations. **Journal of Animal Science**, v.85, p.3022- 3032, 2007b.

MIDDELBOSS, I.S.; BOLER, B.M.V.; QU, A.; WHITE, B.A.; SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C. Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets

with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *Plos One*, v.5, n.3, p.9768, 2010.

MINAMOTO, Y. ; DHANANI, N. ; MARKEL, M.E. ; STEINER, J.M. ; SUCHODOLSKI, J.S. Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v.174, p.463-473, 2014.

MINAMOTO, Y. ; OTONI, C.C. ; STEELMAN, S.M. ; BUYUKLEBLEBICI, O. ; STEINER, J.M. ; JERGENS, A.E. ; SUCHODOLSKI, J.S. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Gut Microbes**, v.6, p.33–47, 2015.

MIQUEL, S.; MARTÍN, R.; ROSSI, O.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G. ; CHATEL, J.M.; SOKOL, H. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. **Current Opinion in Microbiology**, v.16 n.3, p.255-261, 2013.

MITSUOKA T. Intestinal bacterial flora and productivity in domestic animals (I). *J. Jpn. vet. med. Ass.*, v.31, p.199-207, 1978.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) Ad Hoc Committee on Dog and Cat Nutrition: **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**, Rev. National Academies Press, Washington, DC. 2006.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos. Moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje, São Paulo**, v.28, n.163, p.34.38, 2000.

Nutrient Requirements of Dogs and Cats - NRC. **National Academies Press**, NRC, Washington, DC, USA, 2006.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall formation and structure. **Micron**, v.29, n.2/3, p. 207-233, 1998.

OTT, S.J.; MUSFELDT, M.; WENDEROTH, D.F.; HAMPE, J.; BRANT, O.; FOLSCH, U.R.; TIMMIS, K.N.; SCHREIBER, S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. **Gut**, v.53, p.685-693, 2004.

PAAP, P.M; VAN DER LAAK, J.H.; SMIT, J.I; NAKAMURA, N.; BEYNEN, A.C. Administration of *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin®) may improve feces consistency in dogs with chronic diarrhea. **Research opinions in animal and veterinary sciences**, v.6, p.8, p.256-260, 2016.

PARKS, D.H.; TYSON, G.W.; HUGENHOLTZ, P.; AND BEIKO, R.G. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v.30, n.21, p.123-3124, 2014.

PIRGOZLIEV, V.; ODUGUWA, O.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M.R. Diets containing *Escherichia coli*-derived phytase on young chickens and turkeys: Effects on performance, metabolizable energy, endogenous secretions, and intestinal morphology. **Journal of Poultry Science**, v.86, p.705–713, 2007.

PRATRA, A.K. Responses of feeding prebiotics on nutrient digestibility, faecal microbiota composition and short-chain fatty acid concentrations in dogs: a meta-analysis. **The Animal Consortium**, v.5, n.11, p.1743-1750, 2011.

PROPST, E.L., FLICKINGER, E.A., BAUER, L.L., MERCHEN, N.R., FAHEY JR., G.C. A dose-response experiment evaluating the effects of oligofructose and inulin on nutrient digestibility, stool quality, and fecal protein catabolites in healthy adult dogs. **Journal of Animal Science**, v.81 p.3057-3066, 2003.

RIOS-COVIAN, D.; SALAZAR, N.; GUEIMONDE, M.; REYES-GAVILAN, C.G. Shaping the Metabolism of Intestinal *Bacteroides* Population through Diet to Improve Human Health. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.376, 2017.

ROSSI, G.; PENGU, G.; CALDIN, M.; PALUMBO, P.A.; STEINER, J.M.; COHEN, N.D.; JERGENS, A.E.; SUCHODOLSKI, J.S. Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Plos One**, v.9 n.4, p.94699, 2014.

SCOTT, K.P.; MARTIN, J.C.; CAMPBELL, G.; MAYER, C.D.; FLINT, H.J. Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium *Roseburia inulinivorans*. **Journal of Bacteriol**, v.188, p.4340-4349, 2006.

SCHMITZ, S.; SUCHODOLSKI, J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics what is the evidence? **Veterinary Medicine and Science**, v.2, p.71-94, 2016.

SHABALY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, n7, p.675-690, 1996.

SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, A.; NEWMAN, K. E. The effects of mannanoligosaccharides on cecal parameters and concentrations of enteric bacteria in the ceca on *Salmonella* challenged broiler chicks. **Poultry Science**, v.79, p.205-211, 2000.

STRICKLING, J.A.; HARMON, D.L.; DAWSON, K.A.; GROSS, K.L. Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets: influences on nutrient digestion and microbial populations. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, n.2, p.205-219, 2000.

STROMPFOVÁ, V.; KUBASOVÁ, I.; LAUKOVÁ, A. Health benefits observed after probiotic *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 application in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.010, n.16, p.6309-6319, 2017.

STROMPFOVÁ V.; KUBAŠOVÁ I.; FARBÁKOVÁ J.; GANCARČÍKOVÁ S.; MUDROŇOVÁ D.; MAĎARI A.; LAUKOVÁ A. Experimental application of *Lactobacillus fermentum* CCM 7421 in combination with chlorophyllin in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.20 p.8681-8690, 2015.

STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.; GANCARCIKOVA, S. Effectivity of freeze-dried form of *Lactobacillus fermentum* AD1-CCM7421 in dogs. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, n.4, p.347-350, 2012.

SWANSON, K.; GRIESHP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; CHOW, J.; WOLF, B.W. GARLEB, K.A.; FAHEY, G.C. Fructooligosaccharides and lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. **Journal of Nutrition**, v.132, p.3721–3731, 2002a.

SWANSON, K.S.; GRIESHP, C.M.; FLICKINGER, E. A.; BAUER, L.L.; HEALY, H.P.; DAWSON, K.A.; MERCHEN, N.R.; FAHEY JR, G.C. Supplemental Fructooligosaccharides and Mannanligosaccharides Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities, Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. **The Journal of Nutrition**, p. 980-988, 2002b.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G.C. Jr. Portential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition**, p.19-35, 2006.

SILVA, E. N. Probióticos e prebióticos na alimentação de aves. CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000, p. 241-251.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p.S105-S110, 2002.

SCHWARZ, K.K.; FRANCO, S.G.; FEDALTO, L.M., BORGES, S.A.; SILVA, A.V.; PEDROSO, A.C. Efeitos de antimicrobianos, probióticos, prebióticos e simbióticos sobre o desempenho e morfologia do jejuno de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, n.4, p. 35, 2002.

SUNVOLD, G.D.; FAHEY, G.C.; MERCHEN, N.R.; TITGEMEYER, E.C.; BOURQUIN, L.D.; BAUER, L.L.; REINHART, G.A. Dietary fiber for dogs: IV. In vitro fermentation of selected fiber sources by dog fecalinoculum and in vivo digestion and metabolism of fiber supplemented diets. **Journal of Animal Science**, v.73, n.4, p.1099–1109, 1995.



SUCHODOLSKI J.S.; XENOULIS P.G.; PADDOCK C.G.; STEINER J.M.; JERGENS A.E. Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. **Veterinary Microbiology**, v.142, n.3 p.394-400, 2010.

SUCHODOLSKI, J.S.; CAMACHO, J.; STEINER, J.M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, v.66, n.3, p.567-578, 2008.

SWANSON, K. S.; FAHEY, G.C. Jr. Portential role of yeast and yeast by-products in pet foods. **Recent Advances in Pet Nutrition** p.19-35, 2006.

TANG, Y.; MANNINEN, T.J.K.; SARIS, P.E.J. Dominance of *Lactobacillus acidophilus* in the facultative jejunal *Lactobacillus* microbiota of fistulated beagles, **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78 p.7156-7159, 2012.

TESHIMA, E.; RIVERA, N.L.M.; KAWAUCHI, I.M.; GOMES, M.O.S.; BRUNETTO, M.A.; CARCIOFI, A.C. Extrato de levedura na alimentação de cães: digestibilidade e palatabilidade. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. Jaboticabal, 2007.

VICKERS, R.J.; SUNVOLD, G.D., KELLEY, R.L., REINHART, G.A. Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fiber substrates by canine colonic microflora. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.609-615, 2001.

VON ENGELHARD, W. Absorption of short-chain fatty acids from the large intestine. Physiological and clinical aspectis of short-chain fatty acids. Cambridge University Press, p.149-170, 1995.

XENOULIS, P.G.; PALCULICT, B.; ALLENSPACH, K.; STEINER, J.M.; VAN HOUSE, A.M.; SUCHODOLSKI, J.S. Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. **FEMS Microbiology Ecology**, 2008; v.66, n.3, p.579-589, 2008.

ZANUTO, C.A.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C.; SCAPNELLO, C.; MURAKAMI, A.E. Utilização da levedura de recuperação (*Saccharomyces sp.*), seca por rolos rotativos ou por *spray-dry*, na alimentação de leitões na fase inicial. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 705-710, 1999.

ZENTEK, J.; MARQUART, B.; PIETRZAK, T.; BALLEVRE, O.; ROCHAT, F. Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 87, n.11-12, p.397-407, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de aditivos funcionais na nutrição de cães tem tido importância cada vez maior na busca de garantir maior longevidade e saúde para estes animais. Aliar a saúde intestinal e a consistência fecal em um mesmo aditivo tem sido uma busca pela indústria *pet*. Já que, estes animais estão cada vez mais presentes dentro de casa e uma dieta que proporcione fezes de mais fácil limpeza é bastante desejável. Além destas características funcionais, uma dieta palatável é fundamental na indústria *pet food* para que o alimento vendido seja fidelizado e comprado novamente pelo tutor do cão.

A inclusão de probióticos, em particular o *Bacillus subtilis*, podem ser benéficos a saúde intestinal de cães. Tendo em vista que, a inclusão de apenas 33g/tonelada foi capaz de alterar microbiota, aumentando a sua diversidade, além da maior produção de ácido propiônico. Este ácido graxo de cadeia curta, pode ser capaz de reduzir a lipogênese e a aumentar a saciedade, com fortes efeitos no controle do peso. Assim sendo, torna-se um aliado importante na redução da obesidade que tem sido cada vez mais frequente. Além destes benefícios, o *B. subtilis*, melhora a consistência fecal. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para que possamos saber efetivamente qual é a microbiota natural do cão e quais mudanças podem ser benéficas.

Já a utilização da levedura autolisada, apesar de apresentar em sua composição glucanos e mananoglicosacarídeos, os quais podem ser benéficos para fermentação intestinal e até mesmo como imunomoduladores, a levedura autolisada utilizada neste estudo não apresentou benefícios na saúde intestinal. Entretanto, a inclusão de 1% de levedura autolisada adicionada em cobertura à dieta aumenta a palatabilidade de alimentos destinados a cães.

Dessa forma, o probiótico e o prebiótico analisados neste estudo podem ser utilizados em dietas para cães e ajudar tanto a melhorar a saúde intestinal destes animais, quanto a palatabilidade das dietas.



## ANEXOS

## APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 051/2016, referente ao projeto **“PREBIÓTICOS E PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO DE CÃES”**, sob a responsabilidade de **Ananda Portella Félix** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 06/07/2016.

Vigência do projeto	Agosto/2016 até Novembro/2016
Espécie/Linhagem	Cão
Número de animais	16
Peso/Idade	10 kg / 1,5 a 1,6 anos
Sexo	Ambos
Origem	Laboratório do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 051/2016, regarding the project **“PREBIOTICS AND PROBIOTICS IN DOG FEED”** under **Ananda Portella Félix** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 06/07/2016.

Duration of the project	August/2016 until November/2016
Specie/Line	Dog
Number of animals	16
Weight/Age	10 kg / 1,5 to 1,6 years
Sex	Both
Origin	Laboratory at Agricultural Sciences Sector of the Federal University of Paraná

Curitiba, 6 de julho de 2016.

Simone Tostes de Oliveira Stedile  
Presidente CEUA-SCA

